

Studien zur Funktion des Proteasomen-assoziierten Proteins Blm3
in *Saccharomyces cerevisiae*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Chemikerin Marion Fehlker
geb. am 2.12.70 in Lüdinghausen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
 2. Prof. Dr. B. Dahlmann
 3. Prof. Dr. W. Dubiel

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2004

1	ZUSAMMENFASSUNG	9
2	EINLEITUNG.....	11
2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.2	Proteolyse.....	11
2.3	Das Proteasom: Struktur, Biogenese und Lokalisation	13
2.3.1	Das 20S Proteasom in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.3.2	Das 26S-Proteasom.....	14
2.3.3	Biogenese des 20S-Proteasoms	17
2.3.4	Import des Proteasoms in den Zellkern	22
2.4	Funktionen des Proteasoms	24
2.4.1	Ubiquitin/Proteasom-System	24
2.4.2	ERAD und UPR.....	27
2.4.3	DNA-Reparatur.....	30
2.4.4	Apoptose	35
2.5	Blm3	35
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	38
4	MATERIAL UND METHODEN	39
4.1	Material.....	39
4.1.1	Geräte.....	39
4.1.2	Chemikalien und Zubehör	40
4.1.3	Antikörper.....	42
4.1.4	Kits.....	42
4.1.5	Medien	42
4.1.6	Dauerkulturen	43
4.2	Oligonucleotide, Plasmide und Stämme	44
4.2.1	Verwendete Oligonucleotide	44

4.2.2	Verwendete Plasmide	46
4.3	Verwendete <i>E. coli</i>-Stämme	48
4.4	Verwendete <i>S. cerevisiae</i>-Stämme	48
4.5	Molekularbiologische Methoden	51
4.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	51
4.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	51
4.5.3	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe (Teeny Prep).....	52
4.5.4	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	53
4.5.5	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	54
4.5.6	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	54
4.5.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	55
4.5.8	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	55
4.5.9	Transformation von Hefezellen	56
4.5.10	Polymerasekettenreaktion (PCR) (Erlich, 1989, Innis <i>et al.</i> , 1990)	57
4.5.11	Rekombination von PCR-Fragmenten in den TOPO [®] -Vektor	58
4.5.12	Southern Blot-Analyse.....	58
4.6	Zellbiologische Methoden.....	62
4.6.1	Kultur von <i>E. coli</i> -Zellen	62
4.6.2	Kultur von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	62
4.6.3	Pulse Chase für ER-Degradation von CPY* und CTG*	62
4.6.4	Pulse Chase-Analyse der proteasomalen Maturierung	64
4.6.5	Sporulation.....	66
4.6.6	Zellfraktionierung	67
4.6.7	<i>In situ</i> -Aktivitätstest (nach Wolf und Fink, 1975).....	68
4.6.8	Test auf Temperatursensitivität	68
4.6.9	Test auf Bleomycin/Zeocin-Hypersensitivität	69
4.6.10	Test auf Canavanin-Sensitivität	69
4.6.11	Halotest auf H ₂ O ₂ -Sensitivität	69
4.6.12	Direkte Fluoreszenzmikroskopie	70
4.6.13	Überexpressionsstudien	70

4.7	Proteinchemische Methoden	71
4.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	71
4.7.2	Proteinfällungen	71
4.7.3	Zellaufschlüsse	71
4.7.4	Isolierung proteasomaler Komplexe	73
4.7.5	Isolierung nativer proteasomaler Komplexe	73
4.7.6	Isolierung des Proteins Blm3	74
4.7.7	Glycerin-Dichtegradienten	74
4.7.8	<i>In vitro</i> -Aktivitätstest	75
4.7.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	75
4.7.10	Nichtdenaturierendes Gel (Nativgel)	77
4.7.11	Natives Gradientengel	78
4.7.12	Auftrennung von Nativgel-Banden mithilfe der SDS-PAGE	78
4.7.13	2D-Gelelektrophorese	78
4.7.14	Western Blot	81
4.7.15	Proteinsequenzierung	83
5	ERGEBNISSE	84
5.1	Vorarbeiten	84
5.2	Identifizierung des Proteasomen-assoziierten Proteins	85
5.3	Blm3	86
5.3.1	Datenbankinformationen zu Blm3	86
5.3.2	Proteomik	88
5.3.3	Blm3 und PA200	89
5.4	Deletionsmutante $\Delta blm3::HIS3$	90
5.5	Untersuchung von $\Delta blm3$-Zellen auf Phänotypen	90
5.5.1	Untersuchung der Sensitivität gegenüber Bleomycin und Zeocin	91
5.5.2	Temperatursensitivität von $\Delta blm3$ -Zellen	94
5.5.3	Untersuchung der Canavanin-Sensitivität von $\Delta blm3$ -Zellen	94
5.5.4	$\Delta blm3$ -Zellen zeigen keine H_2O_2 -Sensitivität	95

5.6	<i>In situ und in vitro</i>-Aktivitätstests	96
5.6.1	<i>In situ</i> -Aktivität des $\Delta blm3$ -Stamms	96
5.6.2	<i>In vitro</i> -Aktivität des Proteasoms aus dem $\Delta blm3$ -Stamm	97
5.6.3	Einfluss von gereinigtem Blm3 auf die proteasomale Aktivität	98
5.7	<i>In vivo</i>-Aktivität des Proteasoms aus $\Delta blm3$-Stämmen	100
5.7.1	Degradation von FB Pase	101
5.7.2	Degradation der ERAD-Substrate CPY* und CTG*	102
5.8	Lokalisation des Proteasoms in $\Delta blm3$	105
5.9	Glycerin-Dichtegradienten	108
5.10	Zusammensetzung von Proteasomen in wt- und $\Delta blm3$-Zellen	109
5.11	Lokalisation von Blm3	111
5.12	Blm3 und Blm3-GFP-HA im Glycerin-Dichtegradienten	113
5.13	Nicht-denaturierende PAGE von Wildtyp und $\Delta blm3$	115
5.14	Charakterisierung der Nativgelbanden der Proteasomenpräparationen .	118
5.15	Assoziation von Blm3 an proteasomale Vorläuferkomplexe	120
5.16	Nativgele proteasomaler Vorläuferkomplexe	121
5.17	Charakterisierung proteasomaler Vorläuferkomplexe	123
5.18	Proteasomale Maturierung in Wildtyp- und $\Delta blm3$-Zellen	125
5.18.1	Gleichgewichtszustände der Maturierung von Pre2/ $\beta 5$	125
5.18.2	Kinetik der proteasomalen Maturierung	126
5.19	Lokalisation von Blm3-GFP-HA in $\Delta ump1$	128
5.20	Doppeldeletion $\Delta blm3\Delta ump1$	128
5.21	Überexpression von Blm3	130

6	DISKUSSION.....	133
6.1	Blm3 und PA200 als Regulatoren der proteasomalen Aktivität	133
6.2	Blm3 und DNA-Reparatur.....	135
6.3	Lokalisation von Blm3.....	137
6.4	Assoziation von Blm3 an proteasomale Komplexe	139
6.5	In $\Delta blm3$-Zellen ist die Maturierung beschleunigt	141
6.6	Beeinflusst Blm3 das Verhältnis von 20S- zu 26S-Komplexen?	144

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ALDI	Aldehyd-Inhibitor
aa	Aminosäuren
AMC	Aminomethylcoumarin
amp ^r	Amicillinresistenz-Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Base Excision Repair
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CIP	Calf Intestine Phosphatase
cm	Zentimeter
CM	synthetisches Hefemedium
CP	Core Particle
CPY	Carboxypeptidase Y
CTG*	CPY*-transmembran-GFP
d	Tag(e)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DIK	Differential-Interferenzkontrast
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Dinatriummethylenediamintetraacetat
EJ	End Joining
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HOAc	Essigsäure
HRPO	Horse Radish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
kan ^r	Kanamycinresistenz-Gen
kDa	Kilodalton

kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Broth-Medium für <i>E. coli</i>
M	molar
mA	Milliampere
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
nm	Nanometer
NaDOC	Natriumdesoxycholat
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non Homologous End Joining
NLS	Nuclear Localization Signal
NP-40	Nonidet P-40
Nups	Nucleoporine
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen in einem Standardphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm und einer Schichtdicke von 1 cm; eine OD von 1 entspricht etwa 3×10^7 Hefezellen pro ml
ORF	offener Leserahmen (Open Reading Frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFK	Phosphofructokinase
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
PRR	Post-Replication Repair
psi	Pound-force/square inch (lbf/in ²); 1psi = 0,069bar
RP	Regulatory Particle
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minut, Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg-Einheit, Sedimentationskoeffizient
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20®	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit, Einheit der enzymatischen Aktivität
V	Volt
Vh	Voltstunden
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
YPD	Hefevollmedium
z.B.	zum Beispiel
β-NA	β-Naphthylamid
μF	Mikrofaraday

μl	Mikroliter
Ω	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1 ZUSAMMENFASSUNG

Proteasomen sind Protease-Komplexe, die im Nucleo- und Cytoplasma eukaryontischer Zellen vorkommen und an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind. 26S-Proteasomen bestehen aus einem proteolytisch aktiven 20S-Kernkomplex und zwei regulatorischen 19S-Komplexen. Die Regulatorkomplexe erkennen Proteinsubstrate und kontrollieren den Zugang der Substrate in den katalytisch aktiven 20S-Komplex (Glickman und Maytal, 2002). Der hohlzylindrische 20S-Komplex besteht aus vier heptameren gestapelten Ringen, von denen die beiden inneren jeweils sieben verschiedene β -Untereinheiten besitzen, von denen drei katalytisch aktiv sind. Die beiden äußeren enthalten jeweils sieben verschiedene, nicht-katalytische α -Untereinheiten. Die Assemblierung des 20S-Komplexes erfolgt über Halbproteasomen, in denen Ringe aus α -Untereinheiten mit pro- β -Untereinheiten assoziiert sind (Frentzel *et al.*, 1994; Chen und Hochstrasser, 1996; Ramos *et al.*, 1998). Modellvorstellungen zufolge erfolgt die Dimerisierung zweier Halbproteasomen in ein kurzlebiges Intermediat, das naszierende 20S-Proteasom, bevor die aktiven β -Untereinheiten autokatalytisch prozessiert werden (Chen und Hochstrasser, 1996). Der konservierte Maturierungsfaktor Ump1 ist mit proteasomalen Vorläuferkomplexen assoziiert und wird nach der Dimerisierung der Halbproteasomen und der Prozessierung der katalytischen Untereinheiten im Inneren des naszierenden 20S-Proteasoms degradiert (Ramos *et al.*, 1998; Enenkel *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998; Heinemeyer, 2000; Krüger *et al.*, 2001). In Hefen sind Proteasomen hauptsächlich in der Kernperipherie lokalisiert, und auch Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe sind vorwiegend nukleär (Lehmann *et al.*, 2002).

Grundlage dieser Arbeit war die Identifizierung des Proteins Blm3 als Proteasomen-assoziiertes Protein in Kernextrakten aus *S. cerevisiae*. Fluoreszenzmikroskopisch konnte die nukleäre Lokalisation von Blm3 *in vivo* gezeigt werden. Durch Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation und die Charakterisierung von durch native Gelelektrophorese aufgetrennten Komplexen konnte gezeigt werden, dass Blm3 an Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe gebunden vorliegt. Durch native Gelelektrophorese und GFP-Markierungstechniken wurden Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexe in Halbproteasomen und naszierende Proteasomen fraktioniert. Es konnte gezeigt werden, dass Blm3 nicht mit Halbproteasomen, sondern mit

naszierenden 20S-Proteasomen interagiert. Im *Abm3*-Deletionsstamm wurde durch Pulse Chase-Analysen eine beschleunigte Kinetik der Prozessierung des naszierenden Proteasoms und eine beschleunigte Degradation des Maturierungsfaktors Ump1 beobachtet. Das Protein Blm3 verzögert die Reifung des naszierenden Proteasoms in das maturierte 20S-Proteasom. Blm3 übt vermutlich einen koordinierenden oder regulatorischen Effekt auf die Maturierung und letztlich auf die Aktivierung des 20S-Proteasoms aus.

Der grösste Teil dieser Arbeit wurde in Fehlker, M. *et al.*, *EMBO Rep.*, **4** (10): 959-963 veröffentlicht.

Schlagwörter: Blm3, Proteasom, Maturierung, Assemblierung

2 EINLEITUNG

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, allgemein als Bäckerhefe bekannt, ist eine einzellige Sprosshefe und gehört der Klasse der Ascomyceten an. Ascomyceten, auch Schlauchpilze genannt, umschließen die während der Meiose gebildeten Sporen mit einem rundlichen oder schlauchförmigen Ascus (Rose und Harrison, 1991). *S. cerevisiae* durchläuft den Zellzyklus in nur 90 Minuten und ist sowohl genetisch als auch molekularbiologisch hervorragend zugänglich. Mit $1,2 \times 10^7$ Basenpaaren auf 16 Chromosomen besitzt *S. cerevisiae* eines der einfachsten eukaryontischen Genome – das humane Genom umfasst etwa 3×10^9 Basenpaare, das Genom von *E. coli* nur etwa 4×10^6 Basenpaare. Das gesamte Hefegenom ist sequenziert und in Datenbanken zugänglich (Goffeau *et al.*, 1996, Hieter *et al.*, 1996). *S. cerevisiae* kommt sowohl in haploider als auch in diploider Form vor. Die diploide Form bildet während der Meiose Sporen, mit deren Hilfe durch Tetradendisektion die Vererbung genetischer Marker und Mutationen untersucht werden kann. Hefezellen nehmen leicht fremde DNA auf und integrieren sie durch homologe Rekombination in ihr Genom. Gleichzeitig sind zahlreiche geeignete Plasmide und Vektoren sowie Methoden und genetische Marker verfügbar, so dass für die Hefe effektive Techniken zur genetischen Manipulation etabliert sind (Guthrie und Fink, 1991, Sambrook *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1997, Orr-Weaver *et al.*, 1981).

Viele biochemische Prozesse laufen in *S. cerevisiae* ähnlich ab wie in höheren eukaryontischen Zellen, weshalb sich *S. cerevisiae* als Modellorganismus für höhere eukaryontische Zellen anbietet.

2.2 Proteolyse

Nicht nur die Proteinsynthese, sondern auch der Abbau von Proteinen durch hydrolytische Spaltung, die Proteolyse, ist essentiell für das Überleben der Zelle: Durch die Proteolyse wird die Homöostase aufrecht erhalten, während zelluläre Strukturen ständig erneuert werden. Proteine, die aufgrund von Mutationen oder äußeren Einwirkungen wie z. B. Hitze oder oxidativem Stress nicht korrekt gefaltet wurden, müssen abgebaut werden, bevor sie aggregieren. Die Kurzlebigkeit regulatorischer Proteine wie Cycline und Transkriptionsfaktoren wird durch Proteolyse sichergestellt.

In höheren Eukaryonten werden zudem durch den proteolytischen Abbau von Antigenen immunokompetente Peptide hergestellt, die an der Zelloberfläche cytotoxischer T-Zellen präsentiert werden. Durch limitierte Proteolyse werden inaktive Vorstufen von Enzymen, sogenannte Zymogene, durch Abspaltung von Peptiden aktiviert.

Da Proteasen nicht unselektiv zelluläre Proteine abbauen dürfen, erfolgt die Proteolyse durch komplexe proteolytische Systeme, deren Spezifität häufig durch Kompartimentalisierung erreicht wird. Das Lysosom bzw. die Vakuole in Hefe ist als membranumschlossenes Organell ein solches Kompartiment, in das die abzubauenen Proteine und die Proteasen auf spezifischen Wegen, beispielsweise in Vesikeln, eingebracht werden. Das Lysosom bzw. die Vakuole ist für den Abbau von Membranproteinen, extrazellulären und langlebigen Proteinen sowie für die hungerinduzierte Proteolyse zuständig (Thumm, 2000; Thumm und Wolf, 1998).

In prokaryontischen Zellen, die keine membranumschlossenen Zellorganellen besitzen, hat sich das System der Selbst- oder Autokompartimentalisierung (Lupas *et al.*, 1997) entwickelt: Proteolytische Untereinheiten assemblieren zu hohlzylindrischen Komplexen, in deren Innerem, das einen Durchmesser von nur einigen Nanometern hat, sich die aktiven Zentren befinden. Da der Zugang zu den proteolytisch aktiven Zentren gefalteten Proteinen gewöhnlich nicht möglich ist, müssen die abzubauenen Proteine zunächst entfaltet werden. Es wird angenommen, dass das Entfalten der Proteine von ATPasen durchgeführt wird, die auch als „Reverse Chaperone“ oder „Unfoldases“ bezeichnet werden (Lupas *et al.*, 1993).

Ein selbstkompartimentalisierendes System, das beispielsweise in Archaeobakterien, in Prokaryonten und in Eukaryonten vorkommt, ist das Proteasom. Das Proteasom degradiert hauptsächlich Proteine, die durch Ubiquitinierung für diesen Abbauweg markiert wurden. Hierbei handelt es sich vorwiegend um kurzlebige Proteine, die in der Regulation essentieller Zellprozesse wie dem Zellzyklus, der Transkription oder der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Hershko *et al.*, 1998), oder um fehlgefaltete Proteine, die nach der Synthese aus dem ER-Lumen durch retrograden Transport in das Cytoplasma transportiert und dort durch das Proteasom abgebaut werden (Jarosch *et al.*, 2003; Hiller *et al.*, 1996).

2.3 Das Proteasom: Struktur, Biogenese und Lokalisation

Proteasomen kommen in Archaeobakterien, in Prokaryonten und in Eukaryonten vor, allerdings unterscheiden sie sich in der Komplexität ihres Aufbaus (Voges *et al.*, 1999). Anhand ihrer unterschiedlichen Tertiärstruktur lassen sich zwei Haupttypen, das 20S-Proteasom und das Proteasomen-artige Hitzeschockprotein *hsl V*-Protease, unterscheiden (Gille *et al.*, 2003). Beide sind N-terminale nucleophile (Ntn-) Hydrolasen mit N-terminalen Threoninresten (Groll *et al.*, 1997). Sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten setzt sich der hohlzylindrische 20S-Komplex mit C₂-Symmetrie aus vier heptameren gestapelten Ringen zusammen. Die beiden inneren Ringe besitzen jeweils sieben β -Untereinheiten, die beiden äußeren jeweils sieben α -Untereinheiten. Während die α - und β -Untereinheiten in prokaryontischen Proteasomen jeweils identisch sind, sind eukaryontische Proteasomen aus jeweils sieben verschiedenen α - und β -Untereinheiten aufgebaut (Groll *et al.*, 1997). Eine Ausnahme unter den Prokaryonten bildet *Rhodococcus erythropolis*, der jeweils zwei unterschiedliche α - und β -Untereinheiten besitzt (Tamura *et al.*, 1995). Das eukaryontische 26S-Proteasom besteht aus einer proteolytisch aktiven 20S-Untereinheit und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten. Auch in Prokaryonten sind mit dem 20S-Proteasom interagierende ATPase-Komplexe bekannt (Zwickl *et al.*, 1999; Lupas *et al.*, 1997).

Zur Bezeichnung der proteasomalen Untereinheiten existieren verschiedene Nomenklaturen, die in Anhang 1 gegenübergestellt sind.

2.3.1 Das 20S Proteasom in *Saccharomyces cerevisiae*

Das eukaryontische 20S-Proteasom hat eine Länge von 15nm, einen Durchmesser von 11nm und eine Masse von 670kDa (Baumeister *et al.*, 1998). Durch die vier Ringstrukturen der α - bzw. β -Untereinheiten werden im Inneren des Hohlzylinders drei Kompartimente gebildet, wobei sich in dem mittleren Kompartiment die proteolytisch aktiven Zentren befinden (Abb. 1; Baumeister *et al.*, 1988). Entlang der pseudo-siebenzähligen Achse verläuft ein Kanal. α - und β -Untereinheiten besitzen eine Sequenzhomologie von 26% und weisen die gleiche Tertiärstruktur auf (Löwe *et al.*, 1995; Groll *et al.*, 1997). Die α -Untereinheiten besitzen hochkonservierte N-terminale Verlängerungen, die die Eingänge des proteasomalen Kanals verschließen und mit

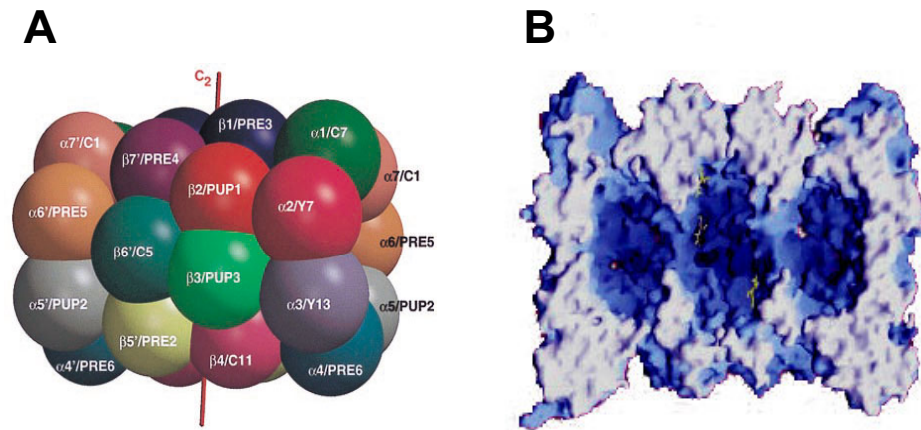


Abb. 1: Das 20S-Proteasom aus *S. cerevisiae*

A Das Kugelmodell zeigt den $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Aufbau und die C_2 -Symmetrie des 20S-Proteasoms (aus: Groll *et al.*, 1999). **B** Durch den Ringaufbau des 20S-Proteasoms entstehen im Inneren des Hohlzylinders drei Kompartimente. Die proteolytisch aktiven Zentren im zentralen Kompartiment sind gelb hervorgehoben (aus: Bochtler *et al.*, 1999).

regulatorischen Komplexen in Wechselwirkung treten können (Groll *et al.*, 2000; Förster *et al.*, 2003). Die meisten der β -Untereinheiten besitzen Prosequenzen, die während der Maturierung des Proteasoms prozessiert werden (Groll *et al.*, 1999). Drei der sieben β -Untereinheiten weisen proteolytische Aktivitäten auf, die mithilfe fluorogener Peptidsubstrate wie folgt charakterisiert wurden: $\beta 1/Pre3$ zeigt peptidylglutamylpeptid-hydrolytische (PGPH) Aktivität und spaltet nach sauren Aminosäuren, $\beta 2/Pup1$ weist trypsinartige Aktivität auf und spaltet nach basischen Aminosäuren und $\beta 5/Pre2$ zeigt chymotrypsinartige Aktivität und spaltet nach hydrophoben Aminosäuren (Dick *et al.*, 1998). Zwischen den drei aktiven Zentren kommt es zu allosterischen Effekten (Dick *et al.*, 1998). Das 20S-Proteasom, dessen Eingänge durch die N-Termini der α -Untereinheiten verschlossen sind, kann durch Wechselwirkung mit dem 19S-Komplex aktiviert werden (Köhler *et al.*, 2001).

2.3.2 Das 26S-Proteasom

Der regulatorische 19S-Komplex, auch PA700 (Proteasomal Activator 700kDa) oder Regulatory Particle (RP) genannt, kann an beide Enden des eukaryontischen 20S-Proteasoms (Core Particle, CP) assoziieren und so ein 26S-Proteasom bilden (Abb. 2; Glickman *et al.*, 1998a). Dabei ist der hervorstehende hintere Teil des 19S-Regulators

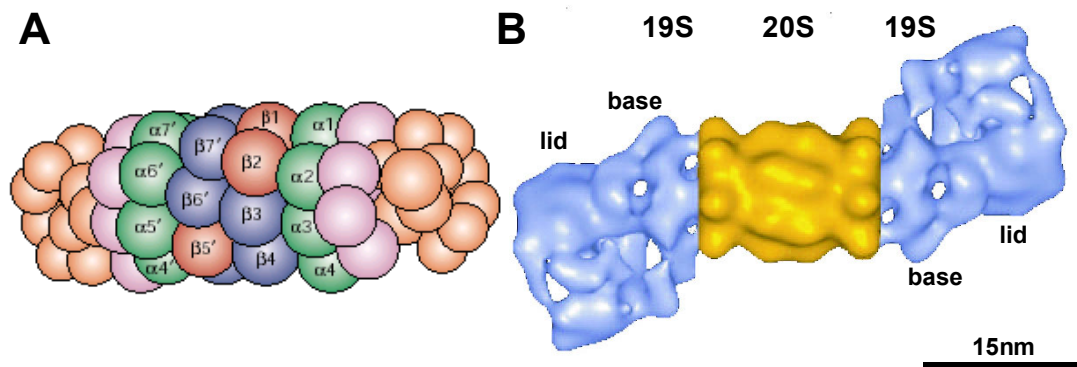


Abb. 2: 26S-Proteasom

A Kugelmodell des 26S-Proteasoms (aus: Klotzel, 2001). **B** Zusammengesetztes Modell der dreidimensionalen Struktur des 26S-Proteasoms aus *Drosophila*, basierend auf elektronenmikroskopischen Daten. Der 20S-Komplex ist in Gelb, die 19S-Komplexe sind in Blau dargestellt (aus: Voges *et al.*, 1999).

distal zu den Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ orientiert (Kopp und Kuehn, 2003). Obwohl bei der Präparation von Proteasomen eine Mischung aus RP_1CP , RP_2CP und freiem 20S-Komplex erhalten wird, scheint die Mehrzahl der 20S-Proteasomen, zumindest in der logarithmischen Wachstumsphase, *in vivo* mit zwei 19S-Komplexen assoziiert zu sein (Bajorek *et al.*, 2003; Leggett *et al.*, 2002; Russel *et al.*, 1999). Das Chaperon Hsp90 ist für die Assemblierung und den Zerfall des 26S-Komplexes von Bedeutung (Imai *et al.*, 2003). Auch die 19S-Lid-Untereinheit Rpn9 ist an der Assemblierung des 26S-Proteasoms beteiligt (Inai und Nishikimi, 2002; Takeuchi *et al.*, 1999). Unter Einwirkung von Stress scheint es zum reversiblen Zerfall des 26S-Proteasoms in 20S- und 19S-Komplexe zu kommen (Bajorek *et al.*, 2003). Zum Einfluss der Wachstumsphase auf das Verhältnis von 26S-Komplexen zu freien 20S- und 19S-Komplexen liegen widersprüchliche Ergebnisse vor: Während Fujimuro *et al.* von einer erhöhten Menge an 26S-Komplexen in der stationären Wachstumsphase berichten, finden Bajorek *et al.* in dieser Phase einen verstärkten Zerfall (Fujimuro *et al.*, 1998b; Bajorek *et al.*, 2003).

Der 19S-Komplex reguliert die proteasomale Aktivität auf vielfältige Weise: Er erkennt die Substrate, entfaltet sie, transportiert sie in das 20S-CP und übt einen allosterischen Einfluss auf die aktiven Zentren aus (Glickman und Maytal, 2002; Kissilev *et al.*, 1999). Der 19S-Komplex besteht aus mindestens 17 Untereinheiten, die sich in Base- und

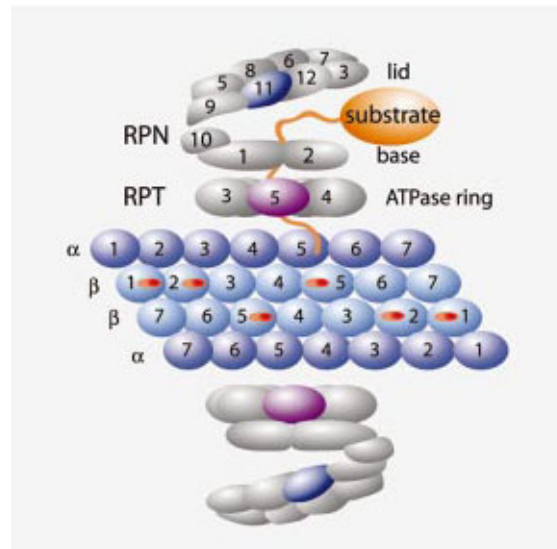


Abb. 3: Der Aufbau des 26S-Proteasoms

Schematische Darstellung des 26S-Proteasoms. Der 20S-Komplex ist aufgeschnitten dargestellt, wobei die proteolytisch aktiven Zentren in Rot eingezeichnet sind (aus: Kostova und Wolf, 2003).

Lidkomplex unterteilen lassen (Abb. 3; Glickman und Maytal, 2002; Glickman *et al.*, 1998a).

Der Basekomplex besteht aus sechs hochkonservierten ATPase- (Rpt1-Rpt6, Regulatory Particle triphosphatases) und drei Nicht-ATPase-Untereinheiten (Rpn1, Rpn2 und Rpn10, Regulatory Particle non-ATPase) (Glickman *et al.*, 1998a). Die ATPase-Untereinheiten gehören zur Familie der AAA-ATPasen (ATPases-associated-with-different-cellular-activities) (Neuwald *et al.*, 1999) und bilden *in vitro* eine hexamere Ringstruktur (Gorbea *et al.*, 2000). Ein Komplex aus 20S- und Basekomplex ist nicht imstande, ubiquitinierte Proteine abzubauen, nicht-ubiquitinierte Proteine werden dagegen degradiert (Glickman *et al.*, 1998b). Die Base-Untereinheit Rpt5 erkennt Ubiquitinketten (Lam *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass der Basekomplex mit den α -Untereinheiten des 20S-Komplexes interagiert und dessen Öffnung bewirkt (Gerlinger *et al.*, 1997; Haracska und Udvardy, 1996; Ferrel *et al.*, 2000), wofür die Base-Untereinheit Rpt2 verantwortlich ist (Köhler *et al.*, 2001). *In vitro* konnte eine chaperoneartige Aktivität des Basekomplexes gezeigt werden, was mit der Annahme, dass der Basekomplex *in vivo* als „reverses Chaperone“ die zu degradierenden Proteine entfaltet, in Übereinstimmung steht (Braun *et al.*, 1999). Die Nicht-ATPase-Untereinheiten Rpn1, Rpn2 und Rpn10 zeigen Wechselwirkungen mit einigen

Untereinheiten des Base- und des Lidkomplexes und scheinen diese beiden Teilkomplexe miteinander zu verbinden (Gorbea *et al.*, 2000). Darüber hinaus bindet Rpn10 polyubiquitinierte Konjugate (Deveraux *et al.*, 1994). Der Lidkomplex besteht aus mindestens acht weiteren Rpn-Untereinheiten (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11 und Rpn12) (Glickman *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass er für die Prozessierung der Polyubiquitinketten der Substrate vor der Degradation essentiell ist (Hartmann-Petersen *et al.*, 2003; Glickman *et al.*, 1998a; Braun *et al.*, 1999). Als Zn^{2+} -abhängige Protease ist Rpn11 für die Deubiquitinierung der Substrate während der proteasomalen Degradation verantwortlich (Yao und Cohen, 2002). Nachdem die Proteinsubstrate mithilfe des 19S-Regulators in das Innere des Proteasoms transportiert wurden, erfolgt dort ihre Degradation durch die katalytisch aktiven proteasomalen Untereinheiten. (Nussbaum *et al.*, 1998).

2.3.3 Biogenese des 20S-Proteasoms

2.3.3.1 Die Assemblierung des Proteasoms in Archae- und Eubakterien

Während das eukaryontische Proteasom jeweils sieben verschiedene α - und β -Untereinheiten aufweist, besteht das Proteasom aus *Thermoplasma acidophilus* aus jeweils 14 identischen α - und β -Untereinheiten (Löwe *et al.*, 1995). Die α -Untereinheiten weisen keine Propeptide auf, dagegen besitzen fünf der sieben β -Untereinheiten N-terminale Prosequenzen (Schmidtke *et al.*, 1996). Die Prosequenzen der katalytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ werden autokatalytisch abgespalten, die Prozessierung der inaktiven Untereinheiten erfolgt dagegen durch die ihnen benachbarten aktiven Untereinheiten (Chen und Hochstrasser, 1996; Heinemeyer *et al.*, 1997; Jäger *et al.*, 1999). In *E. coli* exprimiert, bilden *Thermoplasma*- α -Untereinheiten heptamere Ringstrukturen, während β -Untereinheiten nicht oligomerisieren (Zwickl *et al.*, 1994). Die Koexpression von α - und β -Untereinheiten führt, unabhängig von der An- oder Abwesenheit der β -Propeptide, zur Bildung funktioneller und aktiver Proteasomen (Zwickl *et al.*, 1992). Dies führte zu der Annahme, dass zunächst assemblierte α -Ringe den β -Untereinheiten als Assemblierungs-Plattform dienen (Abb. 4). Auch die Koexpression von α -Untereinheiten aus *Aeropyrum pernix* mit β -

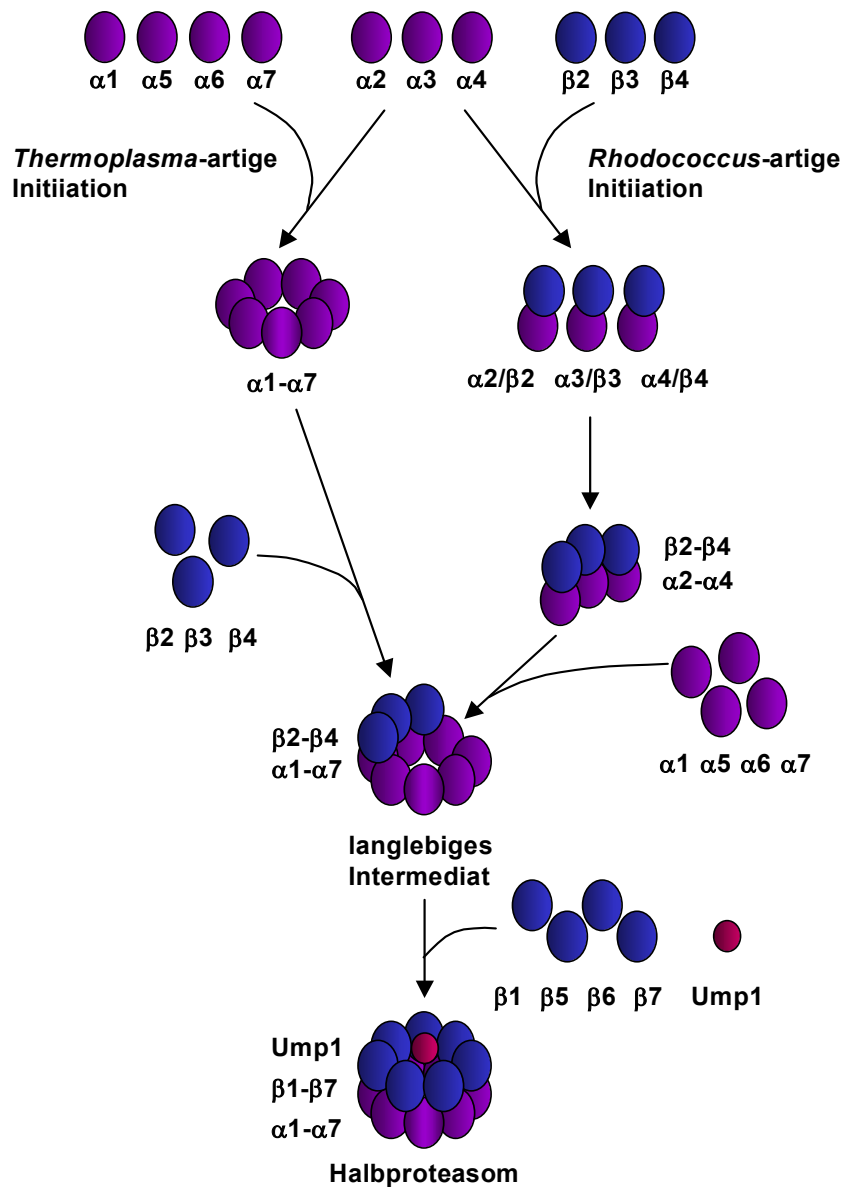


Abb. 4: Modellvorstellungen zu frühen Schritten der proteasomalen Assemblierung

Mögliche Wege zur Bildung eines Halbproteasoms über ein langlebiges Assemblierungsintermediat, das aus allen α-Untereinheiten und den β-Untereinheiten β2, β3 und β4 besteht und in Mauszellen nachgewiesen wurde (Frentzel *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995). Der *Thermoplasma*-artige Beginn der Assemblierung (links) verläuft über die Bildung eines vollständigen α-Rings, an den β-Untereinheiten binden. Die *Rhodococcus*-artigen frühen Assemblierungsschritte (rechts) laufen über die Bildung von α/β-Dimeren ab. Beiden Mechanismen ist der späte Einbau der Untereinheiten β1 und β5-β7 sowie des Maturierungsfaktors Ump1 gemeinsam (nach: Heinemeyer, 2000).

Untereinheiten aus *Archaeoglobus fulgidus* führte über die Bildung von α -Ringern zur Assemblierung proteolytisch aktiver 20S-Proteasomen (Groll *et al.*, 2003). Die Ausbildung von α -Ringern könnte daher Bestandteil eines konservierten Assemblierungswegs von 20S-Proteasomen sein (Groll *et al.*, 2003). Das 20S-Proteasom des Actinomyceten *Rhodococcus erythropolis* besteht aus jeweils zwei Typen von α - und β -Untereinheiten (Tamura *et al.*, 1995). Auch die Expression der *Rhodococcus* α - und β -Untereinheiten in *E. coli* führt zur Bildung funktioneller Proteasomen, wobei bei getrennter Expression weder die α - noch die β -Untereinheiten oligomerisieren (Zühl *et al.*, 1997a; Zühl *et al.*, 1997b). Dies könnte auf die Bildung von Heterodimeren aus α - und β -Untereinheiten als frühe Assemblierungsintermediate hindeuten (Abb. 4). Die Prozessierung der β -Untereinheiten scheint einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der proteasomalen Assemblierung darzustellen: Die Deletion der β -Propeptide führt zu einer starken Verlangsamung, ihre Expression *in trans* zu einer starken Beschleunigung der Bildung von 20S-Proteasomen (Zühl *et al.*, 1997b). Die β -Propeptide scheinen daher nicht nur die vorzeitige Vorliegen katalytisch aktiver β -Untereinheiten zu verhindern, sondern auch späte Schritte der Assemblierung zu unterstützen.

2.3.3.2 Die Assemblierung des Proteasoms in Eukaryonten

Das eukaryontische Proteasom besteht aus jeweils sieben verschiedenen α - und β -Untereinheiten. Seine Assemblierung erfordert zusätzliche Faktoren, die vermutlich assistierend wirken und vorübergehend an das naszierende Proteasom assoziiert sind (Schmidtke *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998). In frühen Schritten der Assemblierung scheint die humane α -Untereinheit C8/ α 7 eine besondere Rolle zu spielen: In *E. coli* exprimiert, bildet sie heptamere Ringstrukturen, bei Koexpression der α -Untereinheiten PROS27/ α 1 und PROS30/ α 6 auch heterooligomere Ringe stark unterschiedlicher Zusammensetzung. Die alleinige Expression von PROS27/ α 1 oder PROS30/ α 6 führt dagegen nicht zur Oligomerisierung (Gerards *et al.*, 1997; Gerards *et al.*, 1998). Weiterhin interagiert C8/ α 7 mit der unprozessierten β -Untereinheit PROS26/ β 7 (Gerards *et al.*, 1997). Die ersten nachgewiesenen proteasomalen Assemblierungsintermediate in höheren Eukaryonten sind 13-15S-Komplexe. Sie enthalten alle α -Untereinheiten und die unprozessierten β -Untereinheiten β 2, β 3 und β 4 (Frentzel *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995; Nandi *et al.*, 1997). Durch den Einbau der noch fehlenden β -

Untereinheiten entsteht aus diesem frühen Vorläuferkomplex das vermutlich kurzlebige Halbproteasom (Nandi *et al.*, 1997). Das Chaperon hsc73 verhindert die Aggregation der Halbproteasomen (Schmidtke *et al.*, 1997). Die Dimerisierung zweier Halbproteasomen führt zu einem Präholoproteasom, das die β -Untereinheiten ausschließlich in unprozessierter Form enthält. Durch genetische Studien in Hefen konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung zweier Halbproteasomen zur Prozessierung der β -Untereinheiten nötig ist (Chen und Hochstrasser, 1996). So ist die Prozessierung von pro-Pre2/ β 5 direkt an die Bildung des Präholoproteasoms aus zwei Halbproteasomen-Vorläuferkomplexen gekoppelt: Zur Ausbildung des aktiven Zentrums, das für die autokatalytische Prozessierung von pro-Pre2/ β 5 benötigt wird, müssen proPre2/ β 5 des einen Halbproteasoms und Pre1/ β 4 des zweiten Halbproteasoms nebeneinander positioniert sein (Chen und Hochstrasser, 1996).

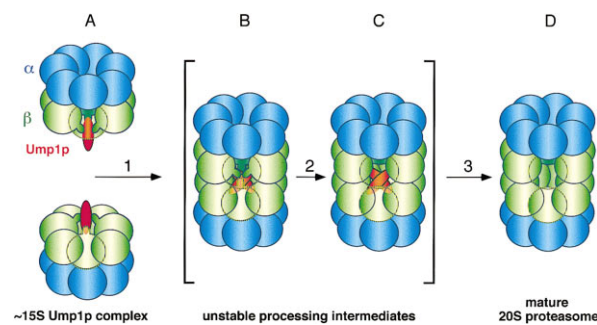


Abb. 5: Modell zu späten Schritten der Assemblierung des 20S-Proteasoms

Abgebildet ist eine schematische Ansicht des 20S-Proteasoms und seiner Vorläuferkomplexe, wobei die α -Untereinheiten in Blau und die β -Untereinheiten in Grün dargestellt sind. Drei der β -Untereinheiten sind mit Verlängerungen gezeichnet, die ihre Propeptide darstellen. Die vorderen β -Untereinheiten sind transparent dargestellt, um den Blick in das Innere des Proteasoms zu ermöglichen. Komplex A ist ein Halbproteasom, das durch die Anwesenheit von Ump1 und unprozessierten β -Untereinheiten charakterisiert ist. In Schritt 1 dimerisieren zwei Halbproteasomen zum Komplex B. Durch eine möglicherweise damit einhergehende Änderung der Konformation oder Position von Ump1 und der Propeptide könnte die autokatalytische Prozessierung der β -Propeptide und die Aktivierung der katalytischen Zentren ausgelöst werden. Ump1 wird im Inneren des neu gebildeten Proteasoms degradiert. Die Komplexe B und C stellen das naszierende Proteasom dar (aus: Ramos *et al.*, 1998).

Die β -Propeptide verhindern nicht nur das vorzeitige Vorliegen proteolytischer Aktivität, sondern sind auch am korrekten Einbau der Untereinheiten, an Schritten der Assemblierung und am Schutz der katalytischen Untereinheiten vor Inaktivierung durch N- α -Acetylierung beteiligt (Arendt und Hochstrasser 1999; Zühl *et al.*, 1997b; Jäger *et al.*, 1999). Die $\beta 5$ -Prosequenz besitzt eine intramolekulare Chaperone-artige Funktion in der Maturierung des Proteasoms. Ihre Deletion ist in *S. cerevisiae* letal (Chen und Hochstrasser, 1996). Die Koexpression der $\beta 5$ -Prosequenz *in trans* führt zur Aufhebung des letalen Phänotyps (Chen und Hochstrasser, 1996). Das nicht-essentielle Protein Ump1, in Mammalia als Pom1 bezeichnet, ist mit proteasomalen Vorläuferkomplexen wahrscheinlich über die Prosequenzen der β -Untereinheiten assoziiert (Ramos *et al.*, 1998). Vermutlich assoziiert Ump1 mit proteasomalen Vorläuferkomplexen bereits bevor die Untereinheiten $\beta 6$ und $\beta 7$ eingebaut werden, d.h. vor der Fertigstellung des Halbproteasoms (Braun, 2002). Ump1 koordiniert die Assemblierung und die Maturierung des Proteasoms (Ramos *et al.*, 1998). Bei der Dimerisierung der Halbproteasomen wird Ump1 im Inneren des Präholoproteasoms eingeschlossen und nach der Reifung des Proteasoms als dessen erstes Substrat degradiert (Abb. 5; Ramos *et al.*, 1998). Die Deletion von Ump1 führt zur Anreicherung unprozessierter proteasomaler Vorläuferkomplexe. Während in *S. cerevisiae* die Deletion des Pre2/ $\beta 5$ -Propeptids in Wildtyp-Zellen letal ist, ist das Pre2/ $\beta 5$ -Propeptid in $\Delta ump1$ -Zellen nicht lebensnotwendig (Ramos *et al.*, 1998). Dies spricht für eine spezifische Wechselwirkung des Pre2/ $\beta 5$ -Propeptids mit dem Maturierungsfaktor Ump1, die möglicherweise eine Konformationsänderung von Ump1 bewirkt.

Trotz ihrer gleichen Masse von etwa 650kDa weisen das Präholoproteasom und das reife 20S-Proteasom ein unterschiedliches Sedimentationsverhalten auf. Dies ist auf Konformationsunterschiede zurückzuführen, die vermutlich durch die Prozessierung der β -Untereinheiten ausgelöst werden (Schmidtke *et al.*, 1997).

Die Expression proteasomaler Untereinheiten wird in *S. cerevisiae* über das Proteasomen-interagierende Protein Rpn4 (Son1, Ufd5) reguliert (Fujimuro *et al.*, 1998a; Xie *et al.*, 2001). Es bindet an PACE-Sequenzen (Proteasome-associated control element), die sich in den Promotoren der für proteasomale Untereinheiten kodierenden Gene in *S. cerevisiae* sowie in Promotoren von Genen, die mit dem Ubiquitin-Proteasom-System in Verbindung stehen, finden (Mannhaupt *et al.*, 1999). Rpn4 aktiviert die Transkription proteasomaler Gene, bindet an Rpn2 und wird Ubiquitin-

unabhängig durch das Proteasom degradiert (Xie *et al.*, 2001). In einem negativen Feedback-Mechanismus reguliert Rpn4 so die Transkription proteasomaler Untereinheiten (Xie *et al.*, 2001). Auch in Mammalia existiert ein Feedback-Mechanismus, der die Proteasomen-Menge auf transkriptioneller Ebene reguliert: Die Inhibition von Proteasomen führt zur Steigerung der *de novo*-Proteinsynthese aller Untereinheiten und der *de novo*-Bildung von Proteasomen (Meiners *et al.*, 2003).

2.3.4 Import des Proteasoms in den Zellkern

Die α -Untereinheiten des 20S-Proteasoms in *Saccharomyces cerevisiae* besitzen in ihren N-terminalen Bereichen klassische Kernlokalisierungssequenzen (cNLS, „Classical Nuclear Localization Sequences“) (Tanaka *et al.*, 1990). Diese bestehen aus ein- oder zweiteiligen kurzen lysin- oder argininreichen Sequenzen und dienen als Signalsequenzen für die cNLS-Importer-Familie der Importin β -artigen Transportfaktoren, die auch Karyopherine genannt werden (Weis, 2003; Görlich und Kutay, 1999; Weis, 1998). Die NLS binden im Cytoplasma an das Adaptermolekül Importin α , das wiederum an den Importrezeptor Importin β bindet (Abb. 6). Dieser kann mit Komponenten der Kernporen interagieren (Görlich *et al.*, 1995). Mithilfe des hydrophoben Rezeptors wird die Kernpore, die eine hydrophobe Barriere darstellt, durchquert und das zu transportierende Protein in den Zellkern befördert (Ribbeck und Görlich, 2002). Dort bindet Importin β an RanGTP, woraufhin der Transportkomplex zerfällt und das Substrat freigegeben wird (Görlich *et al.*, 1996b). Die Direktionalität des Kerntransports wird durch das RanGTPase-System sichergestellt, das den RanGTP-Gradienten über die Kernhülle mit hoher RanGTP-Konzentration im Kern aufrechterhält (Moore, 1998). Anhand GFP-markierter (Green Fluorescent Protein) 20S- und 19S-Untereinheiten sowie biochemischer Zellfraktionierung konnte gezeigt werden, dass in Hefe etwa 80% der Proteasomen im Kernhüllen/ER-Netzwerk lokalisiert sind (Enenkel *et al.*, 1998; McDonald und Byers, 1997; Wilkonson *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1999a). Auch die proteasomale Degradation scheint hauptsächlich dort stattzufinden (Enenkel *et al.*, 1999; Rockel und Mikecz, 2002). Proteasomen werden als proteasomale Vorläuferkomplexe mithilfe von Importin α und Importin β in den Zellkern transportiert, und erst dort erfolgt die Assemblierung und Maturierung zu reifen 20S-Proteasomen (Lehmann *et al.*, 2002). Die Maturierung der Vorläuferkomplexe bewirkt Konformationsänderungen in den N-Termini der α -Unter-

einheiten (Schmidtke *et al.*, 1997). Diese führen dazu, dass die NLS-Sequenzen des reifen 20S-Proteasoms nicht mehr von den Importfaktoren erkannt werden (Lehmann *et al.*, 2002, Tanaka *et al.*, 1990). Adaptermoleküle, die Proteasomen an subzelluläre Kompartimente wie beispielsweise das Kernhüllen/ER-Netzwerk binden, sind bisher noch nicht bekannt.

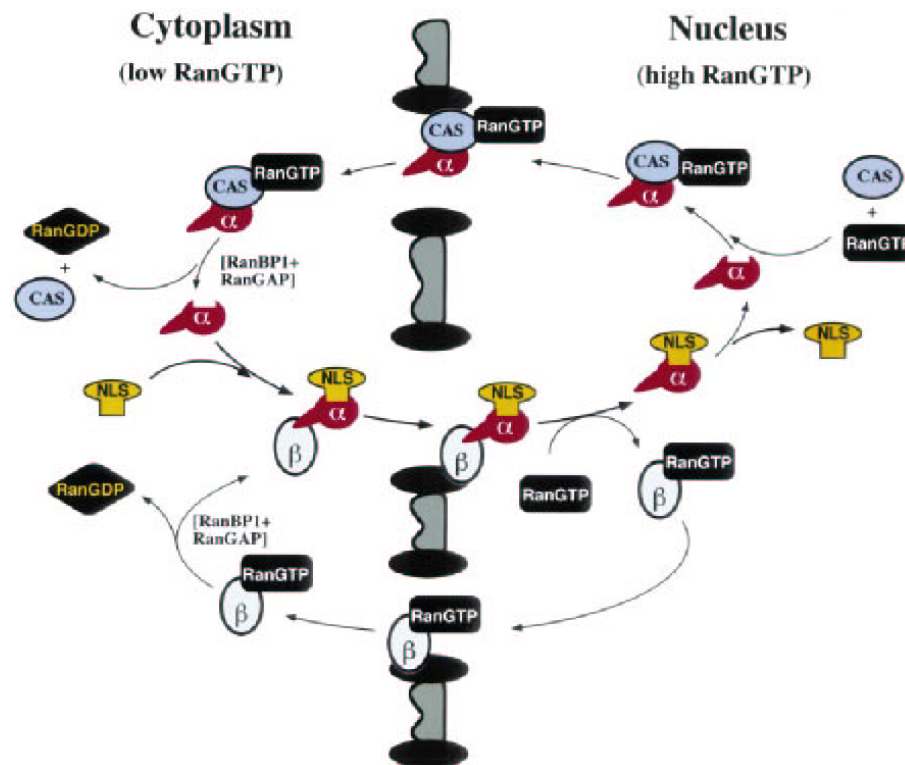


Abb. 6: Der klassische NLS-abhängige Importmechanismus über Importin α/β

Das Adaptermolekül Importin α (Imp α) bindet im Cytoplasma sowohl an das zu transportierende Protein als auch an Importin β (Imp β). Importin β ist für den Kontakt mit dem Nuclear Pore Komplex (NPC) verantwortlich und vermittelt die Translokation des trimeren NLS/Imp α /Imp β -Komplex aus dem Cytoplasma an die nukleäre Seite des NPC (Görlich *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1996a; Weis *et al.*, 1996). Die Bindung von nukleärem RanGTP an Imp β führt zur Ablösung des Komplexes vom NPC und zur Dissoziation von Imp α und Imp β (Görlich *et al.*, 1996b; Rexach und Blobel, 1995). Imp β -RanGTP kann den Nucleus direkt verlassen (Hieda *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu benötigt das unbeladene Imp α für den Re-Export ein spezialisiertes Exportin, CAS genannt (Kutay *et al.*, 1997). Im Cytoplasma müssen sowohl der Imp β /RanGTP-Komplex als auch der Imp α /CAS/RanGTP-Komplex zerlegt werden, bevor Imp α und Imp β erneut für den Import zur Verfügung stehen (aus: Görlich und Kutay, 1999).

Auch in höheren eukaryontischen Zellen sind Proteasomen sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleoplasma lokalisiert (Peters *et al.*, 1994). Das Verhältnis von nukleären zu cytoplasmatischen Proteasomen scheint stark zu variieren und hängt wahrscheinlich vom Zelltyp, den Wachstumsbedingungen, der Zelldichte, der Zellzyklus-Phase und nicht zuletzt von der Art der Fixierung und der Detektion ab (Wójcik und DeMartino, 2003).

2.4 Funktionen des Proteasoms

Das 26S-Proteasom ist für die Degradation fehlgefalteter und kurzlebiger, regulatorischer Proteine verantwortlich. Dadurch ist es an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, die z. B. den Zellzyklus, die Regulation der Transkription, die DNA-Reparatur, die Stress-Antwort, die Apoptose, die Zelldifferenzierung und das transkriptionelle Silencing beinhalten (Hershko und Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000). In den folgenden Abschnitten sollen nur einige dieser zahlreichen Funktionen näher beschrieben werden.

2.4.1 Ubiquitin/Proteasom-System

In Eukaryonten werden etwa 80-90% aller Proteine durch das Ubiquitin/Proteasom-System in Cytoplasma und Nukleus degradiert (Craiu *et al.*, 1997). Neben der Degradation von falsch gefalteten und schadhafte Proteinen, von Zellzyklus-Regulatoren sowie von Onkoproteinen und Tumorsuppressoren ist das Ubiquitin/Proteasom-System auch an der Antigen-Prozessierung sowie an der Aktivierung oder Degradation von Transkriptionsfaktoren beteiligt (Kloetzel, 2001; Ciechanover *et al.*, 2000; Kornitzer und Ciechanover, 2000). Die Mehrzahl der proteasomalen Substrate wird durch Ubiquitin, einem aus 76 Aminosäuren bestehenden hochkonservierten Protein, für die Degradation markiert (Hershko und Ciechanover, 1998). Die Aktivierung bzw. Erkennung von Signalsequenzen innerhalb der abzubauenen Proteine, den sogenannten primären Degradationssignalen oder Degrons, ist vermutlich Voraussetzung für die Markierung der Substratproteine durch Polyubiquitinketten (Dohmen, 2000; Hershko und Ciechanover, 1998). Bestimmte N-Termini beispielsweise können zur Kurzlebigkeit eines Proteins führen, was als „N-end-rule“ bezeichnet wird (Varshavsky, 1997).

Die Polyubiquitinierung beginnt mit der Verknüpfung eines Ubiquitin-Moleküls über seine C-terminale Carboxylgruppe mit einer Aminogruppe des Substrats – entweder in

einem spezifischen Lysinrest oder am N-Terminus - unter Ausbildung einer Amidbindung (Ciechanover *et al.*, 2000; Aviel *et al.*, 2000). Weitere Ubiquitinreste werden durch Ausbildung von isopeptidischen Bindungen zwischen Glycin 76 des zuletzt angehängten und Lysin 48 des anzuhängenden Ubiquitins angefügt. Das Proteasom scheint spezifisch K48-G76-verknüpfte Ubiquitinketten zu erkennen, die aus mindestens 4 Ubiquitin-Molekülen bestehen (Thrower *et al.*, 2000). Ubiquitin und Ubiquitin-artige Proteine sind darüber hinaus auch an einer Vielzahl weiterer Prozesse wie z. B. der DNA-Reparatur, der Aktivierung von Kinasen, der Transkriptionellen Regulation und dem Transport von Membranproteinen beteiligt (Muratani und Tansey, 2003; Aguilar und Wendland, 2003).

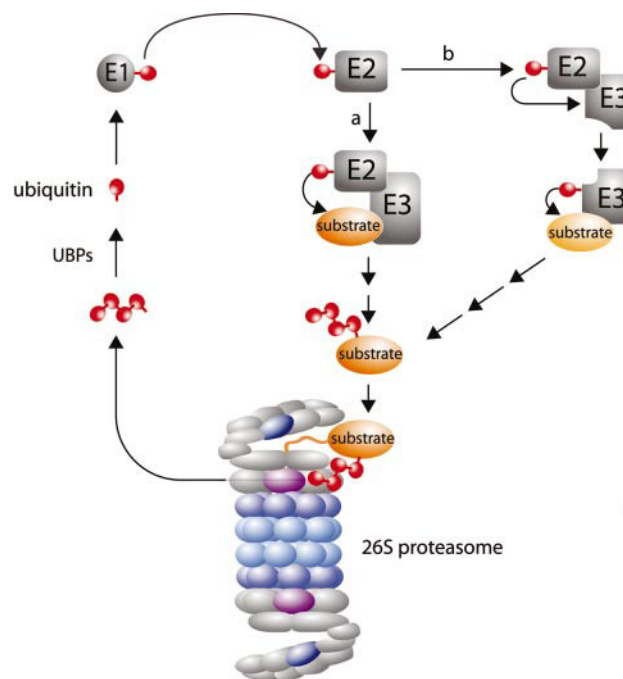


Abb. 7: Das Ubiquitin/Proteasom-System

Das Substratprotein wird unter Mitwirkung des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1, des Ubiquitin-konjugierenden Proteins E2 und der Ubiquitin-Ligase E3 polyubiquitiniert. Während oder nach der Degradation durch das 26S-Proteasom wird die Ubiquitinkette vom Substratprotein abgespalten. Die freie Ubiquitinkette wird durch deubiquitinierende Enzyme zerlegt (aus: Kostova und Wolf, 2003).

Im ersten Schritt der Ubiquitinierung proteasomaler Substrate wird Ubiquitin energieabhängig über eine Thioesterbindung an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) gebunden (Abb. 7). Das so aktivierte Ubiquitin wird auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Ubc, E2) übertragen und dann direkt oder mithilfe von Ubiquitin-Ligasen (E3) mit dem Substrat verknüpft (Hershko und Ciechanover, 1998). Verschiedene Substratrekrutierende Enzyme stellen das Bindeglied zwischen Ubiquitinierungsmaschinerie und Proteasom dar und übertragen das polyubiquitinierte Substrat auf das Proteasom (Hartmann-Petersen *et al.*, 2003). Hierfür scheint die 19S-Untereinheit Rpn10 zusammen mit den vorübergehend an das Proteasom assoziierten Proteinen Rad23 und Dsk2 essentiell zu sein (Wilkinson *et al.*, 2001).

Eine Vielzahl von deubiquitinierenden Enzymen, die Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen (UCHs) und die Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs), spaltet die Ubiquitinkette vom Substrat ab und zerlegt sie in einzelne Ubiquitin-Moleküle (Voges *et al.*, 1999). Als integrales deubiquitinierendes Enzym des Proteasoms ist die Lid-Untereinheit Rpn11 für die Deubiquitinierung von Substraten vor der proteasomalen Degradation verantwortlich (Yao und Kohen, 2002). Deubiquitinierende Enzyme besitzen vermutlich regulatorische Funktionen (Kim *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass es in Archaeobakterien und Prokaryonten zwar Proteasomen, aber weder Ubiquitin noch ein Ubiquitin-konjugierendes System gibt, lässt darauf schließen, dass auch das eukaryontische Proteasom in der Lage sein könnte, nicht-ubiquitinierte Proteine zu degradieren (Maupin-Furlow *et al.*, 2000, Verma und Deshaies, 2000). Die Ornithin-Decarboxylase (ODC) und p21^{Cip1} sind Beispiele für Proteine, die *in vivo* ohne Ubiquitinierung vom Proteasom erkannt und abgebaut werden (Murakami *et al.*, 2000; Sheaff *et al.*, 2000). Im Falle der ODC erfolgt das Targeting durch das Protein Antizym, und es wird angenommen, dass Antizym – oder auch andere kleine Moleküle – für das Targeting weiterer Substrate zum Proteasom verantwortlich ist (Murakami *et al.*, 2000; Glickman und Maytal, 2002). Im Allgemeinen werden proteasomale Substrate in Peptide mit einer Länge von 3 bis 23 Aminosäuren gespalten, wobei die durchschnittliche Länge bei 7 bis 9 Aminosäuren liegt. (Nussbaum *et al.*, 1998; Holzhütter *et al.*, 1999). Die Degradation erfolgt prozessiv, das heißt ein Substrat wird vollständig geschnitten, bevor das nächste Substratprotein in das Innere des Proteasoms eingebracht wird (Nussbaum *et al.*, 1998). Die entstandenen Peptide treten vermutlich durch den axialen Kanal aus dem Proteasom aus, wobei möglicherweise eine Öffnung des axialen Kanals zum Substrateintritt und die andere zur Freisetzung der Peptide dient

(Köhler *et al.*, 2001). Alternativ könnten die entstandenen Peptide durch kleine Poren austreten, die sich zwischen den α - und den β -Ringern befinden (Groll *et al.*, 1997). Die Peptid-Produkte sind kurzlebig und reichern sich nicht in der Zelle an, sondern werden wahrscheinlich durch Proteasen und Aminopeptidasen hydrolysiert (Tamura *et al.*, 1998). In höheren Eukaryonten können einige der erzeugten Peptide durch das Endoplasmatische Retikulum transportiert und über den Major Histokompatibilität Komplex (MHC) Class I dem Immunsystem präsentiert werden (Kloetzel, 2001).

In einigen Fällen werden die proteasomalen Substrate durch das Proteasom nicht vollständig degradiert, sondern lediglich zu einer aktiven Form prozessiert. Das bekannteste Beispiel hierfür ist der p105-Vorläufer einer Komponente des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der durch das Proteasom zu der aktiven Untereinheit p50 prozessiert wird (Orian *et al.*, 1999).

2.4.2 ERAD und UPR

2.4.2.1 ER-Assoziierte Degradation (ERAD)

Sekretorische und membranständige Proteine eukaryontischer Zellen treten über das Endoplasmatische Retikulum (ER) in das zentrale vakuoläre System ein, das sich aus ER, Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen, Plasmamembran und intermediären Transportkompartimenten zusammensetzt (Rapoport *et al.*, 1996). Die Proteine werden kotranslational durch das Sec61-Translokon in das ER-Lumen inseriert oder ungefaltet in das ER-Lumen importiert, wobei Glykosylierungen, die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Abspaltung von Signalsequenzen erfolgen (Leitzgen und Haas, 1998). Das ER-Lumen enthält eine hohe Konzentration an Chaperonen, die naszierende Polypeptide in ihre native Konformation falten (Haigh und Johnson, 2002). Nach Überprüfung des Faltungszustandes eines Proteins wird dieses entweder zu seinem Bestimmungsort weitertransportiert oder, bei nicht korrekter Faltung bzw. nicht erfolgter Assemblierung von Untereinheiten eines Komplexes, degradiert (Ellgaard *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass das Zurechtschneiden der Glykosylierungen durch die Glukosidasen I und II sowie durch die α -1,2-Mannosidase einen Zeitmesser für die Faltung darstellt (Jakob *et al.*, 1998; Jakob *et al.*, 2001). Die Degradation durch das Ubiquitin/Proteasom-System erfordert die retrograde Translokation der falsch gefalteten Proteine aus dem ER in das Cytoplasma (Plempner und Wolf, 1999). Die zentrale Komponente des hierfür erforderlichen Translokons ist Sec61, das einen Kanal

durch die ER-Membran bildet und mit den Membranproteinen Hrd1/Der3 und Hrd3 einen Komplex formt (Abb. 8; Plemper *et al.*, 1999a; Plemper *et al.*, 1997). Unter Beteiligung des im ER-Lumen lokalisierten Chaperons Kar2 (BiP) wird das zu degradierende Protein aus dem ER-Lumen an das Translokon transportiert, indem Kar2 an das ER-Membranprotein Sec63 bindet (Plemper *et al.*, 1999b; Plemper *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1999). Mithilfe eines Komplexes aus der AAA-ATPase Cdc48 (p97), Npl14 und Ufd1 wird das Substratprotein durch den Sec61-Kanal in das Cytoplasma transloziert (Bays und Hampton, 2002; Ye *et al.*, 2001). Die in der ER-Membran lokalisierten Ubiquitin-Ligasen Der3/Hrd1 oder Doa10 erkennen und ubiquitinieren das Substratprotein (Swanson *et al.*, 2001; Bays *et al.*, 2001). Das in der ER-Membran lokalisierte Protein Cue1 rekrutiert das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7 an die cytosolische Seite der ER-Membran (Biederer *et al.*, 1997).

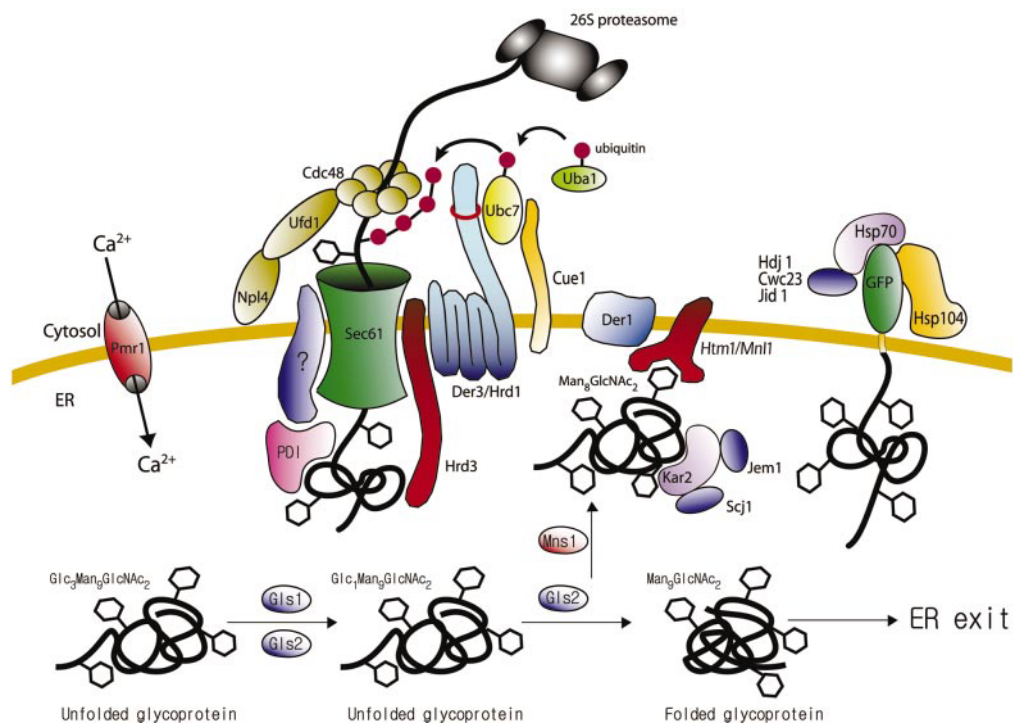


Abb. 8: Das ERAD-System in Hefe

Fehlgefaltete Proteine binden an das Chaperone Kar2 und werden durch den Sec61-Kanal in das Cytoplasma transportiert. Auf der cytosolischen Seite werden sie polyubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert (aus: Kostova und Wolf, 2003).

Nach der Polyubiquitinierung durch Ubc7, Ubc1 und das an die ER-Membran gebundene Ubc6 wird das Substratprotein durch das 26S-Proteasom abgebaut (Hiller *et al.*, 1996; Bays *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002). In Säugerzellen scheinen zu ERAD alternative Degradationswege für fehlgefaltete Proteine zu existieren (Mancini *et al.*, 2003). Auch Membranproteine wie Pdr5*, eine mutierte Version des ABC-Transporters Pdr5, das CFTR-Protein (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) und CTG*, eine membrangebundene Variante von CPY*, werden über die ER-assoziierte Degradation abgebaut (Plempner *et al.*, 1998; Kiser *et al.*, 2001; Taxis *et al.*, 2003). Die Membranproteine werden dabei während der Proteolyse vollständig aus der ER-Membran extrahiert (Plempner *et al.*, 1998). Die Degradation von Membranproteinen ist teilweise unabhängig von einigen der ERAD-Komponenten, die für die Degradation löslicher Proteine benötigt werden. So ist die Degradation von Ubc6 unabhängig vom Sec61-Translokons und Kar2 für den Abbau von Pdr5* nicht erforderlich (Plempner *et al.*, 1998, Walter *et al.*, 2001). Bisher sind keine Adapterproteine bekannt, die das Proteasom für die ER-assoziierte Degradation in der Nähe des Sec61-Translokons binden. Möglicherweise wird das Proteasom durch die Ubiquitinkette des durch den Sec61-Translokons austretenden Substrats an die ER-Membran dirigiert und ist so nur für die Dauer der Degradation dort gebunden (Hirsch und Ploegh, 2001).

2.4.2.2 Unfolded Protein Response (UPR)

Neben der ER-assoziierten Degradation stellt der Signaltransduktionsweg der Unfolded Protein Response (UPR) eine weitere zelluläre Reaktion eukaryontischer Zellen auf das Vorliegen ungefalteter Proteine im ER dar (Chapman *et al.*, 1998). Die luminale Domäne der Transmembrankinase Ire1 kompetiert mit ungefalteten Proteinen um das Chaperon Kar2 (Sidrauski *et al.*, 2002). Steht wegen der Akkumulation ungefalteter Proteine kein Kar2 zur Verfügung, dimerisiert Ire1. Damit einhergehende Konformationsänderungen führen zur Aktivierung der cytoplasmatischen Kinase-Aktivität des Proteins und lösen das nicht-konventionelle Spleißen der HAC1 mRNA aus (Sidrauski *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 1993; Shamu und Walter, 1996). Dies führt zur Synthese des Transkriptionsfaktors Hac1 und letztlich zur transkriptionellen Induktion von über 350 UPR-Zielgenen (Sidrauski und Walter, 1997; Travers *et al.*, 2000). Unter diesen finden sich Gene des gesamten sekretorischen Wegs, unter anderem auch ER-ständige Chaperone und ERAD-Komponenten (Sidrauski *et al.*, 2002). ERAD und UPR sind koordinierte Systeme: effiziente ER-assoziierte Degradation erfordert ein intaktes

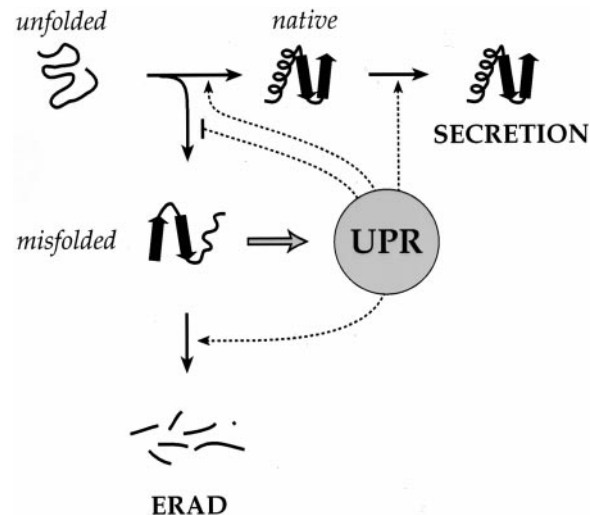


Abb. 9: ERAD und UPR sind koordinierte Mechanismen

Proteine treten in ungefalteter Form in das ER ein. Dort werden sie entweder gefaltet, oligomerisieren und durchlaufen den sekretorischen Weg, oder sie werden nach irreversibler Fehlfaltung durch das ERAD-System eliminiert. Zellstress oder der Verlust des ERAD-Systems führt zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine und dadurch zur Aktivierung des UPR-Systems. Das UPR-System vermindert die Menge fehlgefalteter Proteine, indem es die Faltung in den nativen Zustand unterstützt und die Kapazität des ERAD-Systems steigert (aus: Travers *et al.*, 2000).

UPR-System, und die Induktion der UPR erhöht die Kapazität des ERAD-Systems (Abb. 9; Travers *et al.*, 2000). Der Ausfall des ERAD-Systems führt zur konstitutiven Induktion der UPR, und der gleichzeitige Ausfall des ERAD- und des UPR-Systems ist letal (Friedlander *et al.*, 2000; Travers *et al.*, 2000).

2.4.3 DNA-Reparatur

Schädigungen der DNA werden hauptsächlich durch UV-Licht, ionisierende Strahlung und genotoxische Agenzien sowie durch Fehler während der Replikation verursacht. Durch die Schädigung der DNA kommt es zu einem vorübergehenden Arrest des Zellzyklus und zur Inhibition von Transkription, Replikation und Chromosomen-Segregation, was zur Apoptose führen kann (Hoeijmakers, 2001). Es existieren mindestens vier teilweise überlappende und hochkonservierte Mechanismen zur Reparatur von DNA-Schäden: Nucleotide-Excision Repair (NER), Base-Excision Repair (BER) und die unter dem Oberbegriff Rekombinatorische Reparatur zusammengefassten Mechanismen Homologe Rekombination (HR) und End Joining (EJ) bzw. Non Homologous End Joining (NHEJ) (Hoeijmakers, 2001). Weitere

bekannte Reparatursysteme sind die Transcription-Coupled Repair (TCR) und die Post Replicational Repair (PRR), die einen Spezialfall der Homologen Rekombination darstellt (Hoeijmakers, 2001). Die verschiedenen Reparatur-Mechanismen lassen sich jeweils bestimmten Arten von DNA-Schäden zuordnen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verschiedene DNA-schädigende Agenzien, die durch sie verursachte Art der Schädigung und zugehörige Reparatur-Mechanismen (aus: Hoeijmakers, 2002).

DNA-schädigendes Agens	Art der DNA-Schädigung	Reparatur-Mechanismus
Röntgenstrahlung, Sauerstoffradikale, alkylierende Agenzien	Hydrolyse von Uracil, Bildung von 8-Oxoguanin, Einzelstrangbrüche	Base-Excision Repair (BER)
UV-Licht, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	(6-4) Photoprodukte, Cyclobutan-Pyrimidin Dimere	Nucleotide-Excision Repair (NER)
Röntgenstrahlung, Antitumor-Agenzien (<i>cis</i> -Pt, Mitomycin C)	Doppelstrangbrüche, Bindungen zwischen den DNA-Strängen	Recombinational Repair (HR, EJ, NHEJ)
Replikationsfehler	Fehlpaarungen (A-G, T-C), Insertionen, Deletionen	Mismatch Repair

Röntgenstrahlung, Sauerstoffradikale und alkylierende Agenzien können zum Verlust von Uracil-Basen, zur Bildung von 8-Oxoguanin und zu Einzelstrangbrüchen der DNA führen, die durch den Base-Excision Repair-Mechanismus repariert werden können. UV-Strahlung und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe führen zu Helix-zerstörenden Läsionen, die die Basenpaarung beeinträchtigen und dadurch sowohl die Transkription als auch die Replikation blockieren. Diese Schäden werden durch Nucleotide-Excision Repair behoben. Durch Röntgenstrahlung und Antitumor-Agenzien wie *cis*-Platin und Mitomycin C kann es zu Bindungen zwischen den komplementierenden DNA-Strängen sowie zu Doppelstrangbrüchen kommen, die durch Rekombinatorische Reparatur (HR, EJ, NHEJ) beseitigt werden. Fehler während der Replikation können zu Insertionen, Deletionen oder Fehlpaarungen führen, die durch Mismatch Repair repariert werden (Hoeijmakers, 2001).

Den unterschiedlichen DNA-Reparatur-Mechanismen ist ein Signaltransduktionsweg, der sogenannte DNA Damage Checkpoint-Mechanismus, übergeordnet (Lowndes und Murguia, 2000). Dieser besteht wie alle Signaltransduktionswege aus Sensoren, Transduktoren und Effektoren. Vermutlich existieren für verschiedene Arten von DNA-Schäden jeweils spezifische Sensoren, die diese Schäden erkennen und ein Signal auslösen. Transduktoren leiten das Signal weiter und verstärken es. Effektoren lösen die DNA Damage Response aus, die in einer Verzögerung des Zellzyklus, der Induktion

transkriptioneller Programme und der Reparatur der DNA besteht (Lowndes und Murguia, 2000). Ein Beispiel für die Regulation der DNA Damage Response durch das Proteasom ist die Degradation der Endonuklease Ho aus *S. cerevisiae*. Diese induziert Doppelstrangbrüche in den Genlokus, der für den Maturierungstyp codiert und wird daraufhin in Abhängigkeit von der DNA Damage Response durch das Proteasom degradiert (Kaplun *et al.*, 2000).

In *S. cerevisiae* unterscheidet man entsprechend den genetischen Beziehungen von Mutanten verschiedene Mechanismen der DNA-Reparatur: Die Nucleotide Excision Repair (NER) wird durch RAD23 vermittelt, für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch Homologe Rekombination (HR) ist RAD52 verantwortlich, und RAD6 ist an der Post Replication Repair (PRR) beteiligt (Hoeijmakers, 2001; Hoege *et al.*, 2002). In den folgenden Abschnitten soll auf die Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und auf den Nucleotide Excision Repair-Mechanismus eingegangen werden.

2.4.3.1 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche der DNA entstehen durch ionisierende Strahlen oder Röntgenstrahlung, durch freie Radikale, Chemikalien und durch die Replikation von Einzelstrangbrüchen (Hoeijmakers, 2001). Nach der Detektion von Doppelstrangbrüchen wird eine komplexe Reaktionskaskade ausgelöst, die die Zellzyklus-Maschinerie anhält und Reparaturfaktoren rekrutiert (Khanna und Jackson, 2001). Die Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche sind Homologe Rekombination (HR) und End Joining bzw. Non-Homologous End Joining (NHEJ) (Hoeijmakers, 2001). Die homologe Rekombination führt durch einen Austausch von Einzelsträngen zwischen defekter und intakter Duplex-DNA zur vorübergehenden Bildung eines Moleküls aus vier DNA-Einzelsträngen. Durch eine Kombination aus DNA-Synthese und -Prozessierung wird der defekte DNA-Strang repariert (Cromie *et al.*, 2001). Durch Non Homologous End Joining (NHEJ) werden zwei DNA-Enden miteinander ligiert, die wenig oder keine Homologie aufweisen. Dabei kann es durch Resektion der DNA-Enden zum Verlust von Informationsgehalt der DNA kommen (Cromie *et al.*, 2001). In Hefe treten zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sowohl die homologe Rekombination als auch der NHEJ-Mechanismus auf (Pastink *et al.*, 2001; Lewis und Resnick, 2000). Der Befund, dass die proteolytisch aktive 20S-Untereinheit Pup1/β2 die Temperatursensitivität einer *rad52*-Mutante supprimiert, lässt auf eine mögliche

Beteiligung des Proteasoms an der Rekombinatorischen Reparatur schließen (Nguyen und Livingston, 1997).

Ein Beispiel für die Beteiligung des Ubiquitin-Systems an DNA-Reparatur-Mechanismen liefert das Protein Rad6, das an der Post Replication Repair (PRR), einem Spezialfall der Homologen Rekombination, beteiligt ist. Rad6 ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym und führt nach Schädigung der DNA zur Ubiquitinierung von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), eines Proteins, das an DNA-Stränge bindet und einen Prozessierungsfaktor für DNA-Polymerasen darstellt (Hoege *et al.*, 2002; Warbrick, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Maturierungsfaktor Ump1 als auch die katalytischen proteasomalen Untereinheiten $\beta 2$ /Pup1 und $\beta 5$ /Pre2 für die PRR von Bedeutung sind (Podlaska *et al.*, 2003).

2.4.3.2 Nucleotide Excision Repair (NER)

Der Mechanismus der Nucleotide Excision Repair (NER) ist in *S. cerevisiae* mit dem proteasomalen System verknüpft: Rad23 ist eines von etwa 30 verschiedenen Proteinen, die in *S. cerevisiae* an der NER beteiligt sind; seine genaue Funktion ist noch unbekannt (Friedberg *et al.*, 1995). Rad23 bindet mit dem C-Terminus an Rad4 und kann weitere für die DNA-Reparatur benötigte Faktoren rekrutieren (Jansen *et al.*, 1998; Guzder *et al.*, 1995). Der Rad23/Rad4-Komplex bindet bevorzugt an mit UV-Licht bestrahlte DNA (Jansen *et al.*, 1998). Aminoterminal enthält Rad23 eine Ubl-Domäne (Ubiquitin-like), durch die es über Rpn10 an den 19S-Komplex binden kann (Lambertson *et al.*, 2003). Zellen, in denen RAD23 oder dessen Ubl-Domäne deletiert ist, zeigen eine verminderte NER und damit eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung (Watkins *et al.*, 1993). Gleichzeitige Mutation der 19S ATPase-Untereinheiten Rpt4 oder Rpt6 führt zur Unterdrückung dieses Phänotyps (Gillette *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die NER durch den 19S-Komplex negativ reguliert wird und diese Regulation wiederum durch Rad23 moduliert wird (Abb. 10; Gillette *et al.*, 2001).

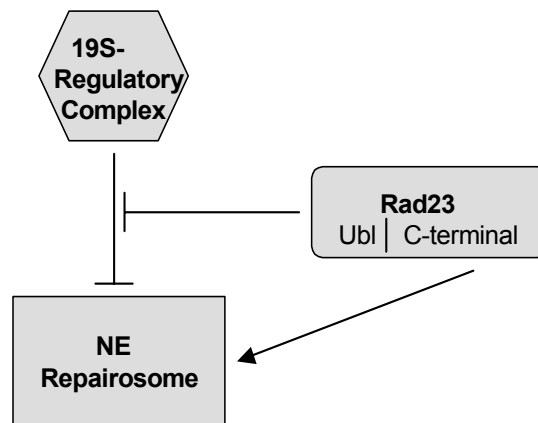


Abb. 10: Modell zur genetischen Interaktion zwischen Rad23 und 19S in der NER.

Der proteasomale 19S-Regulatorkomplex inhibiert die NER *in vivo*. Dieser Effekt wird durch die Wechselwirkung der aminoterminalen Ubl-Domäne des Rad23-Proteins abgeschwächt. Der Carboxyterminus von Rad23 steigert die NER durch direkte Interaktion mit anderen Untereinheiten des Nucleotide Excision Repairosoms. (nach: Gillette *et al.*, 2001)

Es wird vermutet, dass der 19S-Komplex zur Regulation der NER entweder eine Chaperone-artige Aktivität ausübt oder bei der Umformung von Proteinkomplexen assistiert (Russell *et al.*, 1999b). Für den Protease-Aktivator Komplex ClpX aus *E. coli*, der wie die 19S-Untereinheiten Rpt1-6 zur Familie der AAA-ATPasen gehört, ist bekannt, dass er sowohl eine regulatorische Rolle in der Proteolyse als auch eine nicht-proteolytische Rolle in der Zerlegung eines Protein-DNA-Komplexes während der Lysogenie des Bakteriophagen Mu spielt (Mhammedi-Alaoui *et al.*, 1994).

Eine weitere Verbindung zwischen NER und dem Ubiquitin/Proteasom-System stellt das an der NER beteiligte Protein Rad4 dar, das durch das 26S-Proteasom degradiert zu werden scheint (Sweder und Madura, 2002). Die Stabilität von Rad4 scheint dabei von Rad23 kontrolliert zu werden (Lommel *et al.*, 2002). Auch das an der NER beteiligte Protein p48 wird durch proteasomale Degradation reguliert (Fitch *et al.*, 2003).

Die Transkription einer Reihe von Genen, die am Nucleotide Excision Repair-Mechanismus oder am Base Excision Repair-Mechanismus beteiligt sind, wird - wie eine Vielzahl an der proteasomalen Degradation beteiligter Proteine - durch das Proteasomen-assoziierte Protein Rpn4 moduliert (Jelinsky *et al.*, 2000).

2.4.4 Apoptose

Der Begriff Apoptose bezeichnet eine Reihe charakteristischer morphologischer Ereignisse, die mit der Aktivierung des programmierten Zelltods einhergehen (Wyllie *et al.*, 1980). Dazu gehören das Schrumpfen der Zelle, die Chromatin-Kondensation und die Fragmentierung des Zellkerns (Wyllie *et al.*, 1980). Auch in dem einzelligen Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* ist Apoptose zu beobachten (Jin und Reed, 2002; Fröhlich und Madeo, 2000). Der programmierte Zelltod kann durch eine Mutation in der AAA-ATPase Cdc48 (Madeo *et al.*, 1997), durch Überexpression des aus Säugetieren stammenden Apoptose-Regulators Bax (Ligr *et al.*, 1998) oder durch oxidative Bedingungen (Madeo *et al.*, 1999) herbeigeführt werden. Durch H₂O₂ oder Alterung wird die Caspase Yca1 aktiviert, die für den von der Proteinsynthese abhängigen Zelltod in Hefe verantwortlich ist (Madeo *et al.*, 2002). Auch ein zelleigenes Protein, das den Mating-Prozess aktiviert, der Pheromon α -Faktor, kann in Hefezellen, die nicht zum Mating imstande sind, die Apoptose induzieren (Severin und Hyman, 2002).

Das Ubiquitin/Proteasom-System spielt eine noch weitgehend ungeklärte Rolle in der Apoptose. Viele Proteine des Apoptose-Mechanismus werden durch das Ubiquitin/Proteasom-System degradiert (Yang und Yu, 2003; Varshavsky, 2003). Ein Beispiel hierfür ist das Protein Cdc6, das für die Initiation der DNA-Replikation erforderlich ist und nach Induktion der Apoptose Ubiquitin- und Proteasom-abhängig degradiert wird (Blanchard *et al.*, 2002). Das Ubiquitin/Proteasom-System scheint in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren entweder pro- oder antiapoptotisch zu wirken (Wójcik, 1999). Mit Stm1 ist in Hefe ein Zelltod-aktivierendes Protein bekannt, durch dessen Synthese oder proteasomale Degradation die H₂O₂-induzierte Apoptose reguliert wird (Ligr *et al.*, 2001).

2.5 Blm3

C. W. Moore untersuchte 1991 die Punktmutante *blm3-1*, die hypersensitiv auf das radiomimetische Agens Bleomycin reagiert. Bleomycine werden aus dem Bakterium *Streptomyces verticillus* isoliert und bilden eine Familie hydrophiler Antitumor-Antibiotika (Ishizuka *et al.*, 1967). In Gegenwart von Sauerstoff und zweiwertigen Eisenionen induziert Bleomycin Doppelstrangbrüche der DNA über einen Mechanismus, der die Bildung freier Radikale beinhaltet (Petering *et al.*, 1990;

Steighner und Povirk, 1990). Darüber hinaus verursacht Bleomycin Läsionen in der Plasmamembran von *S. cerevisiae* (Beaudouin *et al.*, 1993; Moore, 1999). Phleomycine sind den Bleomycinen strukturverwandt (Umezawa, 1979). Im Gegensatz zu sechs weiteren untersuchten Mutanten, in denen sich die Mutationen rezessiv verhielten, zeigte die *blm3-1*-Mutante Bleomycin-Hypersensitivität auch im heterozygot Diploiden (Moore, 1991). Des Weiteren zeigte die *blm3-1*-Mutante Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid (Moore, 1991). Das *BLM3*-Gen wurde durch Komplementation der Bleomycin-Hypersensitivität der *blm3-1*-Punktmutante mithilfe einer Genbank kloniert (Evans Febres *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass auch der Deletionsstamm *Δblm3* Bleomycinhypersensitivität aufweist (Evans Febres *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass Blm3 am Transport von Bleomycin durch die Plasmamembran in das Innere der Zelle oder an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sein könnte. Das humane Homologe zu Blm3, PA200 (Proteasomal Activator, 200kDa), ist im Nukleus lokalisiert und aktiviert das Proteasom *in vitro* hinsichtlich der Degradation fluorogener Peptidsubstrate (Ustrell *et al.*, 2002). Da sich PA200 nach γ -Bestrahlung durch die Ausbildung intranukleärer punktförmiger Ansammlungen wie einige DNA-Reparatur-Faktoren verhält, wird auch für PA200 eine Beteiligung an der DNA-Reparatur vermutet (Ustrell *et al.*, 2002).

Durch affinitätschromatographische Reinigung (TAP, tandem-affinity purification) Protein A-markierter Proteine mit anschließender Elution der an die Säule gebundenen Proteinkomplexe durch Spaltung an einer TEV-Schnittstelle, anschließender SDS-PAGE und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse der Proteinbanden wurden Proteinkomplexe aus *S. cerevisiae* charakterisiert (Gavin *et al.*, 2002). Über Flag-markierte Proteine wurden in einem ähnlichen Ansatz durch Affinitätschromatographie mit anschließender SDS-PAGE und massenspektrometrischer Analyse der erhaltenen Proteinbanden ebenfalls Proteinkomplexe aus *S. cerevisiae* isoliert und identifiziert (Ho *et al.*, 2002). Die gewonnenen Datensätze sind über die Biomolecular Interaction Network Database zugänglich (BIND, <http://www.bind.ca>; Bader *et al.*, 2003). Das Protein Blm3 wurde als Komponente von fünf Komplexen detektiert, darunter nicht nur Komplexe, die über die proteasomalen Untereinheiten Pre8/ α 2 und Scl1/ α 1 isoliert wurden, sondern auch Komplexe, die über das Flag-markierte Protein Sir4 sowie über das TAP-markierte Protein Zds2 gereinigt wurden. Das nukleäre Protein Sir4 liegt in

einem Komplex mit Sir2 und Sir3 vor und ist am transkriptionellen Silencing an Telomeren beteiligt (Critchlow und Jackson, 1998). Ein weiterer Bestandteil des isolierten Sir4-assoziierten Komplexes ist Srp1, ein Protein, das am Import von Proteinen in den Zellkern beteiligt ist (Weis *et al.*, 1996). Der dem Protein Zds2 assoziierte Komplex wird der Signalübertragung zugeordnet, wobei die molekulare Funktion von Zds2 unbekannt ist (Gavin *et al.*, 2002, Bader *et al.*, 2003). Als einzige proteasomale Untereinheit wurde in diesem Komplex Pre10/ α 7 gefunden. Die mithilfe der markierten proteasomalen Untereinheiten Pre8/ α 2 und Scl1/ α 1 isolierten Komplexe enthalten im Wesentlichen weitere Untereinheiten des Proteasoms.

In einem früheren Ansatz wurden durch massenspektroskopische Analyse affinitäts-gereinigter Proteasomen Nucleotid-sensitive Proteasomen-interagierende Proteine identifiziert (Verma *et al.*, 2000). Hierbei wurde mit Ymr247c ein potentiell Homolog zu Blm3 als an den 19S-Regulator assoziiertes Protein beobachtet, Blm3 dagegen wurde nicht gefunden.

In *S. cerevisiae* ist die Transkription vieler Gene, die mit der Proteindegradation in Verbindung stehen, koreguliert (Jelinsky *et al.*, 2000). Eine Koregulation des Gens *BLM3* mit proteasomalen Genen konnte nicht beobachtet werden (Jelinsky *et al.*, 2000).

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Funktion eines hochmolekularen, Proteasomen-assoziierten Proteins, das in affinitätschromatographisch isolierten Proteasomenpräparationen detektiert worden war. Daraus ergaben sich folgende Zwischenziele:

- Identifizierung des hochmolekularen, Proteasomen-assoziierten Proteins durch Peptide-Mass-Fingerprinting,
- Herstellung und phänotypische Untersuchung einer Deletionsmutante,
- Charakterisierung des proteasomalen Komplexes oder der proteasomalen Komplexe, an den oder die das hochmolekulare Protein assoziiert ist.

Durch die Identifizierung des hochmolekularen, Proteasomen-assoziierten Proteins als Blm3 ergaben sich durch bereits veröffentlichte bzw. im Laufe der Arbeit publizierte Daten neue Fragestellungen:

Aufgrund der Bleomycin-Hypersensitivität der *blm3-1*-Punktmutante und der $\Delta blm3$ -Deletionsmutante wurde eine Beteiligung des Proteins Blm3 an der DNA-Reparatur vermutet (Moore, 1991; Evans-Febres *et al.*, 2001; vgl. Kapitel 2.5). Daher sollte die folgende Frage untersucht werden:

- Ist die Bleomycin-Hypersensitivität der $\Delta blm3$ -Deletionsmutante reproduzierbar?
Gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins Blm3 an der DNA-Reparatur?

Durch die proteasomale Degradation von Stm1 wird die Apoptose in *S. cerevisiae* reguliert, und die zugehörige $\Delta stm1$ -Deletionsmutante verhält sich Bleomycin-hypersensitiv (Ligr *et al.*, 2001; vgl. Kapitel 2.4.4). Daher sollte folgende Frage geklärt werden:

- Gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Blm3 an der Apoptose?

Das zu Blm3 homologe Protein PA200 fungiert *in vitro* als Proteasomen-Aktivator (Ustrell *et al.*, 2002; vgl. Kapitel 2.5). Daraus ergaben sich die weiteren Fragen:

- Ist Blm3 *in vitro* ein Proteasomen-aktivierendes Protein?
- Übt Blm3 *in vivo* einen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms aus? Zur Klärung dieser Frage sollte exemplarisch die Degradation der cytosolischen FBPase sowie die ER-assoziierte Degradation von CPY* und CTG* analysiert werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Agarosegel-Kammer und Geltray	Renner
Blotting-Apparatur Transfer-Blot Semidry System	pQLAB
Centricon 100	Amicon
Eismaschine AF-10	Scotsman
Elektrophoresekammer Mini ProteanII	Biorad
Elektroporationsküvetten	EQUIBIO
Elektroporator Gene Pulser	BioRad
Feinwaage MC1	Sartorius
Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software	SLT
French [®] Pressure Cell Press	SLM-AMINCO
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -70°C	puffer hubbard
Geltrockner Drystar	Hölzel
Heizblock Dri-Block DB3	Techne
Inkubator Innova 4230	Brunswick Scientific
Ionenaustauscher Milli-Q Plus	Millipore
Kamera (Mikroskop) C 5985-10	Hamamatsu
Kühlzentrifuge 54178	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman
Kühlzentrifuge RC24	Sorvall
Leuchtkasten	Roth
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph
Mikroskop DMR	Leica
Mikrowelle Mikro-Chef FM B935	Moulinex
Minigelkammern MiniProtean II™	BioRad
Netzgerät Model 200/2.0	BioRad
PCR-Gerät UNO Block	Biometra
Phosphorfluoroimager FLA-3000	Fuji
Photometer Ultraspec III	Pharmacia
Pipettus-Akku	Hirschmann
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor	Amersham
Rotor SS34	Sorvall
Rotor SW40	Beckman
Schüttelwasserbad	GFL
Tischschüttler Swip	Eduard Bühler
Tischzentrifuge	Eppendorf
Ultrazentrifuge L-70	Beckman
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall
UV-Tisch	Appligen
Vakuumtrockner	Labcono

Vortexer Vortex-Genie2	Scientific Industries
Waage BP2100S	Sartorius
Wasserbad U3	Julabo

4.1.2 Chemikalien und Zubehör

Acrylamid 4K-Lösung (30%) (29% Acrylamid 4, 1% Bisacrylamid 2K)	Roth
Acrylamid 4K-Lösung (40%) (39% Acrylamid 4, 1% Bisacrylamid 2K)	Roth
Agarose	Serva
ALDI	P. Henklein
Ampholine, Isodalt 3-10	Serva
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	AppliChem
Amplify®	Amersham Pharmacia
Apyrase	Sigma
Avidin	ICN
Bacto® -Agar	Difco
Bacto® -Tryptone	Difco
Bacto® -Peptone	Difco
Bleomycin	Sigma
BSA, Fraktion V	Serva
Complete Protease Inhibitor	Roche
Coomassie Serva Blue R	Serva
Desthiobiotin	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dinatriummethylenediamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
Dnase I-EP	Sigma
DTT	AppliChem
Essigsäure	Merck
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
fluorogene Peptidsubstrate	Bachem Biochemica
Geneticin® (G418-Sulfat)	GibcoBRL
Glasperlen 0,45-0,55 mm	Sigma
α-D-Glucose	Roth
Glusulase	DuPont NEN
Glycin	AppliChem
Glycerin	Roth
Harnstoff	AppliChem
Hefeextrakt	Difco
Hering Sperma DNA	Promega
IgG-Sepharose	Amersham
Isobutanol	Merck
Isopropanol	J. T. Baker
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	AppliChem

Lithiumacetat	Sigma
Lysozym	Serva
Magermilchpulver	Difco
Magnesiumchlorid	AppliChem
Magnesiumsulfat	Sigma
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	J. T. Baker
Mikrotiterplatten, schwarz	Dynatec
Molekulargewichtsmarker, DNA	New England Biolabs
Molekulargewichtsmarker, Protein prestained	Amersham
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
Nitrocellulose BA-S85	Schleicher und Schuell
Oligonucleotide	BioTeZ Berlin Buch
PCR-Polymerase und –Puffer	Roche
Polyethylenglycol (PEG 4000)	Fluka
Ponceau-S	Sigma
PMSF	Roth
PVDF-Membran	Millipore
Protein A-Sepharose	Pharmacia
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A	Boehringer-Mannheim
Röntgenfilme X-Omat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
Salzsäure (37%)	Merck
SeeBlue™ Pre-Stained Standard-Marker	Novex
Seakem LE Agarose	FMC bioproducts
Shrimp alkalische Phosphatase	Roche
Sterilfilter 0,2µm, 0,45µm	Schleicher und Schuell
Streptactin-Sepharose	IBA
Supplemente für CM-Medium	Sigma
Taq-Polymerase und PCR-Puffer	Roche
T4 DNA Ligase	Roche
TRAN ³⁵ S-LABEL (³⁵ S-Methionin/Cystein)	ICN
TRIS	AppliChem
TEMED	BioRad
Triton X-100	Sigma
Tween 20®	AppliChem
Yeast Nitrogen Base	Difco
Zeocin	Invitrogen
Zymolyase-20T	Seikagaku
3MM Papier	Whatman

4.1.3 Antikörper

α -Blm3	diese Arbeit, Dr. Pineda, Berlin
α -Cim3	Prof. Dr. D. H. Wolf
α -FBPase	Prof. Dr. D. H. Wolf
α -GFP (Living Colors [®] A. v. Peptide Antibody)	Becton Dickinson
α -HA (HA.11, Clone 16B12)	BABCo
α -HA (mAb 12CA5)	Böhringer Mannheim
α -Pre2	PD Dr. W. Heinemeyer
α -Pre6	Prof. Dr. D. H. Wolf
rabbit anti-mouse, HRPO-konjugiert	Sigma
goat anti-rabbit, HRPO-konjugiert	Dianova
rabbit anti-guinea pig, HRPO-konjugiert	Sigma

4.1.4 Kits

Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gelreinigungskit	Qiagen
TA TOPO Cloning Kit	Invitrogen

4.1.5 Medien

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die entsprechenden Medien mit 2% (Hefe) bzw. 1% (*E. coli*) Bacto-Agar gemischt. Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser (Millipore-Anlage) zubereitet. Der pH-Wert wurde auf pH5,5 (für *S. cerevisiae*) bzw. pH7,5 (für *E. coli*) mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt. Alle Medien wurden 20min bei 120°C autoklaviert.

4.1.5.1 Medien für Hefekulturen

Synthetisches Vollmedium (CM)

Yeast Nitrogen Base –AA/AS	0,17%
D-Glucose	2%
Ammoniumsulfat	0,5%
Dropout powder	0,13%

Dropout powder

Adenin (Hemisulfat)	2,5g	L-Leucin	3,6g	L-Threonin	12,0g
L-Arginin (\cdot HCl)	1,2g	L-Lysin (\cdot HCl)	1,8g	L-Tryptophan	2,4g
L-Asparaginsäure	6,0g	L-Methionin	1,2g	L-Tyrosin	1,8g
L-Glutamat (Na-Salz)	6,0g	L-Phenylalanin	3,0g	L-Valin	9,0g
L-Histidin	1,2g	L-Serin	22,5g	Uracil	1,2g

Zur Selektion auf Hefestämme mit bestimmten Auxotrophiemarkern wurde das CM-Medium mit Dropout powder versetzt, dem die den Markern entsprechenden Komponenten nicht zugesetzt waren. Zur Induktion des GAL1-Promotors wurde das CM-Medium mit 2% Galactose anstelle der Glucose hergestellt.

Vollmedium (YPD)

Yeast Extract	1,0%
Bacto [®] -Pepton	2,0%
D-Glucose	2,0%

Zur Selektion auf Hefe-Kolonien, die ein Kanamycin-Resistenzgen tragen, wurden dem Medium nach dem Autoklavieren (max. 60°C) 200µg/ml Kanamycin (G418-Sulfat) zugesetzt.

4.1.5.2 Medien für *E. coli*-Kulturen

Vollmedium (LB)

Yeast Extract	0,5%
Bacto [®] -Trypton	2,0%
NaCl	2,0%

Zur Selektion auf Plasmide, die ein Ampicillin-Resistenzgen tragen, wurden dem fertigen Medium 100mg/l Ampicillin zugesetzt.

SOC-Medium für *E. coli*-Transformation

Yeast Extract	0,5%
Bacto [®] -Trypton	2,0%
D-Glucose	0,4%
NaCl	10mM
KCl	2,5mM
MgCl ₂	10mM

4.1.6 Dauerkulturen

Für Hefe-Dauerkulturen wurde 1ml einer Flüssigkultur mit 1ml sterilem 30%igem Glycerin (w/v) gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

Für *E. coli*-Dauerkulturen wurde 1ml einer Flüssigkultur mit 1ml einer sterilen Lösung aus 65%igem Glycerin (v/v), 0,1M MgSO₄ und 0,025M TRIS/HCl, pH8 gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

4.2 Oligonucleotide, Plasmide und Stämme

4.2.1 Verwendete Oligonucleotide

Oligonucleotid	Sequenz	Verwendung
2 (4150-27)	5'-GTT GTC GAC GTG CAA CAA GAT AAT ATC-3'	3'-Ende von <i>BLM3</i> , zur chromosomalen Integration von Markierungen strang- abwärts, sense
7 (4156-81)	5'-GCT TCT AAT AAT GTG GTT GGA TCT GAA ATT GAC GGA TTA CTT TGA TTT TGA ACT AAG GTC GCT ACA TAA GAA CAC CTT TGG-3'	zur Deletion von <i>YFL007W</i> mit <i>HIS3</i> ; +61bp strang- abwärts von <i>YFL007W</i> + 3'-Ende von <i>HIS3</i> , anti- sense
8 (4374-81)	5'-ATC ATT GTT CGT TAG CTA GCT TTG CAC ATT AAT TTT TCG ATT TGT TAC CGC CAG ATC CGC TGC ACG GTC CTG TTC CCT AGC- 3'	zur Deletion von <i>YFL007W</i> mit <i>HIS3</i> ; -53bp strang- abwärts von <i>YFL007W</i> + Promotorregion von <i>HIS3</i> , sense
9 (7523-29)	5'-AAA <u>ACT AGT</u> TCT ATG AAA CCA ACC TCT GC-3'	<u>SpeI</u> + Promotor von <i>BLM3</i> , zur PCR-Kontrolle der <i>Abm3</i> -Deletion, sense
13 (8008-23)	5'-AAT GCT TGG CCA GAG CAT GTA TC-3'	Sequenz aus <i>HIS3</i> -Gen zur Überprüfung der <i>Abm3</i> - Deletion durch PCR, anti- sense
14 (10328-21)	5'-CCG TTG TCG GCC TGA ATC CTC-3'	Region strangaufwärts von <i>YFL007W</i> für Southern- Sonde, sense
15 (10329-22)	5'-CCA GTT ATG GAC GAT ATC AGA C-3'	Region strangabwärts von <i>YFL007W</i> für Southern- Sonde, anti-sense
21 (00627-20)	5'-CAT GTC TGT CGA GAT AGT GG-3'	Sequenzierung des 3'- Bereichs von <i>YFL007W</i> , sense
22 (00628-21)	5'-ATG TGG TTG GAT CTG AAA TTG-3'	Sequenzierung des 3'- Bereichs von <i>YFL007W</i> , anti-sense
23 (01570-30)	5'-AAA <u>GGA TCC</u> GGC ATA GTA ACT TCT CCA TAG-3'	<u>BamHI</u> + 3'-Bereich von <i>BLM3</i> ohne Stopp, zur chromosomalen Integration von Markierungen strang- abwärts von <i>BLM3</i> , anti- sense

24 (01571-48)	5'-AAA <u>GAA TTC</u> TGA TTC ATA TTA GTA TAG GAT ATT AAG CAC ATA TCT AGA-3'	<u>EcoRI</u> + 3'-Bereich von <i>BLM3</i> mit Stopp, zur chromosomalen Integration von Markierungen strang- abwärts von <i>BLM3</i> , sense
25 (01572-39)	5'-AAA <u>CTC GAG</u> CTG GTG AAC GAT ACG CCC TCG TGT ATA TAC- 3'	<u>XhoI</u> + 3'-Bereich von <i>BLM3</i> , zur chromosomalen Integration von Markierungen strang- abwärts von <i>BLM3</i> , anti- sense
28 (08296-33)	5'-AAA <u>GGT ACC</u> TGT TGT CAC TCA TTA TCC TAT TGC-3'	<u>KpnI</u> + ca. -1000bp strang- aufwärts von <i>YMR247C</i> , zur Amplifizierung des Deletionsprodukts; sense
29 (08297-32)	5'-AAA <u>CGG CCG</u> ATC ACA GTT AGA AAG CAA GT-3'	<u>EagI</u> + ca. +1000bp strangabwärts von <i>YMR247C</i> zur Amplifizierung des Dele- tionskonstrukts; anti-sense
35 (15184-24)	5'-CGG CTG CGT GCC GGG TAA TAA ATC-3'	Primer für Sonde strangaufwärts von <i>BLM3</i> zur Überprüfung der kanMX-Deletion durch Southern Blot-Analyse, sense
36 (15185-20)	5'-GCA GCT TTA CCT TCT TAC CG-3'	Primer für Sonde strangabwärts von <i>BLM3</i> zur Überprüfung der kanMX-Deletion durch Southern Blot-Analyse, anti-sense
37 (15186-21)	5'-CGA TGT TTC TTC GAT AAA AGG-3'	Primer für Sonde strang- abwärts von <i>YMR247C</i> zur Überprüfung der kanMX- Deletion durch Southern Blot-Analyse, sense
38 (15187-19)	5'-GGC CTT GTT ACA TCC GCC C-3'	Primer für Sonde strang- aufwärts von <i>YMR247C</i> zur Überprüfung der kanMX- Deletion durch Southern Blot-Analyse, anti-sense
41 (22273-89)	5'-GCA TAC ATA AAC TTT ATC ATT GTT CGT TAG CTA GCT TTG CAC ATT AAT TTT TCG ATT TGT TAC CGC CAT TAA GCA AGG ATT TTC TTA AC-3'	-68b strangaufwärts von <i>BLM3</i> + 3'-Ende von <i>LEU3</i> , zur Herstellung des GAL-Überexpressions- Konstrukts für <i>BLM3</i> , sense

42 (22274-87)	5'-GGG ATA AGG TCT TGT TAG TAA TGG GAA TGG GTG ATT TGA TAT CAT CGT CAT TGT TAG CGG TCA TTT TAA GCT TAA TAT TCC CTA TAG-3'	70b aus dem 5'-Bereich von <i>BLM3</i> + 3'-Bereich von <i>GAL</i> , zur Herstellung des GAL-Überexpressions- Konstrukts für <i>BLM3</i> , anti- sense
ire1-P1	5'-AAA ACA GCA TAT CTG AGG AAT TAA TAT TTT AGC ACT-3'	zur Amplifizierung des Deletionskonstrukts <i>Δire1::kanMX</i> aus K66; R. Hitt
ire1-P2	5'-TAA TGC AAT AAT CAA CCA AGA AGA AGC AGA GGG GCA-3'	zur Amplifizierung des Deletionskonstrukts <i>Δire1::kanMX</i> aus K66; R. Hitt

4.2.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pRS316	<i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, Amp ^R , URA3	NewEnglandBiolabs
pJJ215	<i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, HIS3	Jones und Prakash, 1990
pJJ244	<i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, URA3	Jones und Prakash, 1990
pJJ250	<i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, LEU2	Jones und Prakash, 1990
YIp5	<i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, Amp ^R , URA3, integrativer Vektor	Struhl <i>et al.</i> , 1979
pYES2	Shuttle-Vektor zur Galaktose- induzierbaren Expression rekombinanter Proteine in <i>S. cerevisiae</i>	Invitrogen
pCRII-TOPO	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , zur direkten Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
BluescriptIIKS (pKS)	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i>	Stratagene
pSL1190	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i>	Pharmacia
pFAGa kanMX6	<i>E. coli</i> -Vektor zur Herstellung von kanMX-Deletionskonstrukten	Longtine, 1998
pBS-HU	pKS, enthält <i>HIS3</i> aus pJJ215 (BamHI/PstI, 5'-3') und <i>URA3</i> aus pJJ244 (NsiI/PvuII, 3'-5')	C. Enenkel
pBSFlu	pKS, enthält GFP-HA	C. Enenkel
YIplac128- ump1::LEU2	integratives Plasmid zur Deletion von <i>UMP1</i> , <i>LEU2</i> ; SacI/XhoI	Ramos <i>et al.</i> , 1998
YIplac211- PRE2-HA	integratives Plasmid zur Herstellung eines <i>PRE2</i> -HA-Fusionsgens, <i>URA3</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
YIplac128- UMP1-HA	integratives Plasmid zur Herstellung eines <i>UMP1</i> -HA-Fusionsgens, <i>LEU2</i> ; NcoI	Ramos <i>et al.</i> , 1998

YIp5-UMP1-GFP-HA	integratives Plasmid, <i>URA3</i> , enthält <i>UMP1</i> -HA (Sall/HindIII aus YIplac128-UMP1-HA) und GFP in KpnI; Linearisierung mit BstXI	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
YIp5-UMP1-ProA	integratives Plasmid, <i>URA3</i> , enthält <i>UMP1</i> -HA (Sall/HindIII aus YIplac128-UMP1-HA) und Protein A in KpnI; Linearisierung mit BstXI	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
YIp5-UMP1-GFP-Strep	integratives Plasmid, <i>URA3</i> , entstand durch Ersetzen der HA-Markierung in YIp5-UMP1-GFP-HA durch den Strep-Tag II (BamHI); Linearisierung mit BstXI	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
pBS-PRE6-GFP-HA-HU	zur Integration von GFP-HA-HU in den C-Terminus von <i>PRE6</i> , Sall/XhoI	Enenkel <i>et al.</i> , 1998
pBS-PRE6-GFP-Strep	zur Integration von GFP-Strep in den C-Terminus von <i>PRE6</i> , Sall/XhoI	Enenkel <i>et al.</i> , 1998
pBS-C6-ProA-HIS-URA	<i>PRE6</i> -ProA <i>HIS URA</i> , EcoRI	Enenkel <i>et al.</i> , 1998
pBS-RPN1-GFP-HA-HU	zur Integration von GFP-HA-HU in den C-Terminus von <i>RPN1</i> , SacI/XhoI	P. Wendler
pBS-RPN11-GFP-HA-HU	zur Integration von GFP-HA-HU in den C-Terminus von <i>RPN11</i> , SacI/XhoI	P. Wendler
pSL1190-PRE2-GFP-HA-HU	zur Integration von GFP-HA-HU in den C-Terminus von <i>PRE2</i> , Sall/XhoI	B. Braun
pCT40b	<i>prc1-1</i> (HA) ₃ <i>URA</i> (CPY*)	Hiller <i>et al.</i> , 1996
pMA1	TDH3-Promotor, <i>prc1-1</i> GFP <i>HIS URA</i> (CTG*)	C. Taxis
pCRII-7/8	<i>Abm3::HIS3</i> -Konstrukt; EcoRI	diese Arbeit
pCRII-28/29	<i>Aymr247c::kanMX</i> -Konstrukt; KpnI/EagI	diese Arbeit
pCRII-ire1-P1/P2	<i>Aire1::kanMX</i> -Konstrukt; EcoRI	diese Arbeit
pCRII-35/36	Sonde für Southern Blot-Analyse der Deletion <i>Abm3::kanMX</i>	diese Arbeit
pCRII-37/38	Sonde für Southern Blot-Analyse der Deletion <i>Aymr247c::kanMX</i>	diese Arbeit
pBS-Flu-2/23	enthält den C-Terminus von <i>BLM3</i> als Sall/BamHI-Fragment; SpeI/EagI	A. Lehmann
pBS-ProA-2/23	enthält den C-Terminus von <i>BLM3</i> als Sall/BamHI-Fragment und die Protein A-Sequenz in BamHI	diese Arbeit
pBS-HU-24/25	enthält den Bereich 3' von <i>BLM3</i> als EcoRI/XhoI-Fragment; XhoI/EagI	A. Lehmann
pSL1190-24/25-HU	aus pBS-HU-24/25, über XhoI/EagI eingesetzt in pSL1190	A. Lehmann
pSL1190-2/23-GFP-HA-	aus pBS-HU-24/25 und pBS-Flu-2/23; SpeI/XhoI	A. Lehmann

24/25-HU		
pSL1190-2/23- ProA-HA- 24/25-HU	aus pBS-ProA-2/23 (Sall/NotI) und pSL1190-24/25-HU; SpeI/XhoI	diese Arbeit

4.3 Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F'80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZY A-argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+) <i>supE44 thi-1</i> <i>gyrA96</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
TOPO10F'	F' { <i>lacIq</i> , Tn10(<i>Tet</i> ^R)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7679 <i>galU galK rspL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

4.4 Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
WCG α	<i>MAT</i> α <i>his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i> <i>can GAL</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1993
WCG α	<i>MAT</i> α <i>his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i> <i>can GAL</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1993
WCG α PRE6-ProA (PCE6)	<i>PRE6-ProA::HIS3::URA3</i>	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
WCG α PRE6-GFP- HA (GCE6)	<i>PRE6-GFPHA::HIS3::URA3</i>	Enenkel <i>et al.</i> , 1998
WCG α PRE6-GFP- Strep	<i>PRE6-GFPStrep::HIS3::URA3</i>	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
WCG α PRE6-ProA	<i>PRE6-ProA::HIS3::URA3</i>	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
WCG α PRE2-GFP- HA	<i>PRE2-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus WCG α , B. Braun
WCG α RPN1-GFP- HA	<i>RPN1-GFPHA::HIS3::URA3</i>	P. Wendler
WCG α RPN11- GFP-HA	<i>RPN11-GFPHA::HIS3::URA3</i>	P. Wendler
WCG α UMP1-GFP- HA	<i>UMP1-GFPHA::HIS3::URA3</i>	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
WCG α UMP1-ProA	<i>UMP1-ProA::HIS3::URA3</i>	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
WCG α UMP1 GFP- Strep	<i>UMP1-GFP Strep::HIS3::URA3</i>	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
WCG α PRE2HA (JD138)	<i>PRE2-HA::Ylplac211</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
WCG α UMP1HA (JD129)	<i>UMP1-HA::Ylplac128</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
WCG α PRE2HA- UMP1-HA (JD133)	<i>PRE2-HA::Ylplac211 UMP1- HA::Ylplac128</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998

YWO0343	<i>MAT α ura3-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-locre can1-100 prc1-1</i>	M. Hiller
YWO0358	<i>MAT a ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-locre can1-100 prc1-1</i>	M. Hiller
<i>Δblm3</i>	<i>Δblm3::HIS3</i>	aus WCGa, diese Arbeit,
<i>Δblm3::KAN</i>	<i>Δblm3::kanMX6 prc1-1</i>	aus YWO0343, diese Arbeit,
<i>Δblm3 PRE6-ProA (ΔP6)</i>	<i>PRE6-ProA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 PRE6-GFP-HA</i>	<i>PRE6-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 PRE6-GFP-Strep (ΔS6)</i>	<i>PRE6-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 PRE2-GFP-HA</i>	<i>PRE2-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 RPN1-GFP-HA</i>	<i>RPN1-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 RPN11 GFP-HA</i>	<i>RPN11-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 UMP1 GFP-HA</i>	<i>UMP1-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 UMP1-ProA</i>	<i>UMP1-ProA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 UMP1-GFP-Strep</i>	<i>UMP1-GFP Strep::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 PRE2-HA</i>	<i>PRE2-HA::Yiplac211</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 UMP1-HA</i>	<i>UMP1-HA::Yiplac128</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 PRE2-HA UMP1-HA</i>	<i>PRE2-HA::Yiplac211 UMP1-HA::Yiplac128</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 Δump1</i>	<i>Δblm3::HIS3 Δump1::LEU2</i>	aus <i>Δblm3</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 Δymr247c</i>	<i>Δblm3::kanMX6 Δymr247c::kanMX6 prc1-1</i>	aus YWO0343, diese Arbeit
<i>Δblm3 Δymr247c RPN1-GFP-HA</i>	<i>RPN1-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3 Δymr247c</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 Δymr247c RPN11-GFP-HA</i>	<i>RPN11-GFPHA::HIS3::URA3</i>	aus <i>Δblm3 Δymr247c</i> , diese Arbeit
<i>Δblm3 Δire1</i>	<i>Δblm3::HIS3 Δire1::kanMX6</i>	diese Arbeit
<i>Δymr247c</i>	<i>Δymr247c::kanMX6 prc1-1</i>	aus YWO0358, diese Arbeit
<i>Δump1</i>	<i>Δump1::LEU2</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Δump1 BLM3-GFP HA</i>	<i>BLM3-GFPHA::URA3 HIS3</i>	aus <i>Δump1</i> , diese Arbeit
<i>BLM3-GFP-HA</i>	<i>BLM3 GFPHA::URA3 HIS3</i>	aus WCGa, A. Lehmann
<i>BLM3-ProA</i>	<i>BLM3 ProAHA::URA3 HIS3</i>	aus WCGa, diese Arbeit
<i>GAL-BLM3-ProA</i>	<i>GAL::LEU2-Blm3</i>	aus BLM3 ProA, diese Arbeit
<i>GAL-BLM3</i>	<i>GAL::LEU2-BLM3</i>	aus WCGa, diese Arbeit

<i>pre1-1 pre2-2</i>	<i>MAT a his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pre1-1 pre2-2</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1993
<i>cim3-1</i>	<i>Mata ura 3-52 leu2-Δ1 his3-Δ200 cim3-1</i>	Ghislain <i>et al.</i> , 1993
<i>cim5-1</i>	<i>Mata ura 3-52 leu2-Δ1 his3-Δ200 cim5-1</i>	Ghislain <i>et al.</i> , 1993
<i>K66</i>	<i>W303-1c der1-2/der1-2 Δire1::kanMX/Δire1::kanMX MET GFP::TRP1/MET-GFP::TRP1</i>	zur Amplifizierung von <i>Δire1::kanMX</i> ; R. Hitt

4.5 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die in Sambrook *et al.* (1989), Guthrie und Fink (1991) und Struhl *et al.* (1987-1995) angegebenen Standardprotokolle verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet und bei Raumtemperatur gearbeitet sowie bei maximaler Drehzahl (14000rpm) zentrifugiert. DNA wurde in TE-Puffer gelöst. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Millipore-Anlage) zubereitet und, falls sie auf lebende Zellen angewandt wurden, autoklaviert.

4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der Quiagen Miniprep-Kit entsprechend der Vorschrift des Herstellers verwendet.

4.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

2ml einer stationären Hefekultur in Selektionsmedium werden bei 3000rpm 10min abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und in 200µl Breaking Buffer resuspendiert. Dazu wurden 200µl säuregewaschene Glasperlen (0,45-0,5mm Durchmesser, pH7) und 200µl Phenol/Chloroform gegeben. Das Gemisch wurde 2min bei höchster Stufe auf dem Vortexer geschüttelt und dann 5min abzentrifugiert. Die wässrige Phase des Überstands wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetatlösung (pH5,0) und dem 2,5-fachen Volumen eiskalten Ethanol wurde die DNA ausgefällt. Anschließend wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 6µl Milli-Q-Wasser resuspendiert. Davon wurde 1µl zur Transformation in *E. coli* verwendet. Da bei dieser Methode chromosomale Hefe-DNA mitisoliert wird, ist die erhaltene Plasmid-DNA nur von geringer, für die Replikation in *E. coli* aber ausreichender Reinheit.

Breaking Buffer

Triton X-100	2% (v/v)
SDS	1%
NaCl	100mM
TRIS/HCl	1mM
EDTA	1mM
pH8,0	

Phenol/Chloroform

Phenol in Chloroform 50% (v/v)
 pH7,5 mit TRIS/HCl äquilibriert

4.5.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe (TeenY Prep)

10ml einer stationären Hefekultur wurden 5min bei 3500rpm abzentrifugiert und in 1ml SEB resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und kurz abzentrifugiert. Das in 400µl resuspendierte Zellpellet wurde mit 0,1ml Zymolyaselösung versetzt und 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 10sec zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 400µl TE gelöst. Dann wurden 90µl Lösung 4 zugegeben, gut gemischt und 30min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 80µl Lösung 3 wurde der Ansatz 60min auf Eis inkubiert. So konnten die Proben auch über Nacht aufbewahrt werden. Nach 10min Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Ethanol auf 1,5ml aufgefüllt und gemischt. Nach 5sec Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in 500µl TE gelöst. Nach Zugabe von 2,5µl RNase-Lösung wurde der Ansatz 30min bei 37°C inkubiert und anschließend die DNA mit 500µl Isopropanol gefällt. Nach 5min Zentrifugation bei RT wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge 5min getrocknet. Dann wurde die DNA in 50µl TE resuspendiert.

SEB

Sorbitol 0,9M
 EDTA 0,1M
 pH 7,5

SEM

Sorbitol 1M
 EDTA, pH 7,5 0,1M
 β-Mercaptoethanol 14mM

Zymolyase-Lösung

2mg/ml in 1M Sorbitol

Lösung 3

KOAc	5M
------	----

Lösung 4

EDTA, pH8,0	0,28M
TRIS	0,44M
SDS	2,2%

RNase-Lösung

10mg/ml in H₂O

10 x TE-Puffer

TRIS/HCl	0,1 M
EDTA	0,01 mM
pH 7,5	

4.5.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Identifizierung und Analyse wurde DNA durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen geschnitten.

Analytischer Verdau:

Für einen analytischen Verdau wurden 2µl DNA in einem 20µl-Ansatz, der den entsprechenden NEB-Puffer enthielt, mit je 0,1µl der benötigten Enzyme versetzt und 1h, in der Regel bei 37°C, inkubiert.

Präparativer Verdau von Vektoren:

Für einen präparativen Verdau wurden 20µl DNA in einem 300µl-Ansatz, der den entsprechenden NEB-Puffer enthielt, mit je 5µl der benötigten Enzyme versetzt und 3h oder über Nacht, in der Regel bei 37°C, inkubiert.

Präparativer Verdau von Insert-DNA:

Für einen präparativen Verdau wurden 30µl DNA in einem 400µl-Ansatz, der den entsprechenden NEB-Puffer enthielt, mit je 5µl der benötigten Enzyme versetzt und 3h oder über Nacht, in der Regel bei 37°C, inkubiert.

Agarose-Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Proben des DNA-Verdau wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in einer Flachbett-Elektrophoresekammer in einem 0,8%igen Agarose-Gel mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 100-120V aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Als Längenstandard diente 1kb-Marker. Mit diesem Verfahren konnten DNA-Fragmente im Bereich von 0,3 bis 12kb aufgetrennt und anschließend im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

10x DNA-Probenpuffer

Glycerin	50% (v/v)
TRIS/HCl	1M
Bromphenolblau	0,1%
pH8,0	

10x TAE-Puffer

TRIS/Acetat	400mM
EDTA	10mM
pH8,5	

4.5.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach einem präparativen DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese konnte DNA aus Agarose-Gelen durch Ausschneiden des gewünschten Fragments aus dem Agarose-Gel und Isolierung mithilfe des QIAgen Gel Extraction Kits präpariert werden. Die Isolierung der DNA erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers. Die so erhaltene DNA konnte ohne weitere Zwischenschritte weiterverwendet werden.

4.5.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung erfolgte direkt nach einem präparativen DNA-Verdau durch Zugabe von 2µl Calf Intestine Phosphatase (CIP) bzw. Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und 30min Inkubation bei 37°C sowie anschließender 20minütiger Desaktivierung bei 65°C. Alternativ wurden 25µl DNA in einem 100µl-Ansatz in Phosphatasepuffer mit 1µl CIP bzw. SAP versetzt und nach 30min Inkubation bei 37°C 20min bei 65°C desaktiviert.

4.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase und dem dazugehörigen Ligationspuffer durchgeführt, wobei in einem 10µl-Ansatz 1µl T4 DNA-Ligase eingesetzt wurde. Der Ansatz wurde 30min bis 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

4.5.8 Transformation von *E. coli*-Zellen

4.5.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die chemische Transformation

Zellen aus einer Dauerkultur wurden auf einer LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie in 5ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 100ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium wurden mit 2ml der Kultur angeimpft und 2h bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 5min auf Eis gekühlt und 10min bei 3500rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 40ml eiskaltem TfbI resuspendiert und nach 5minütiger Inkubation auf Eis 10min bei 3500rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 4ml eiskaltem TfbII resuspendiert und anschließend 15min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in Volumina zu je 100µl in vorgekühlte Eppis aliquotiert und bei –80°C eingefroren.

TfbI

KOAc	30mM
RbCl	100mM
CaCl ₂	10mM
MnCl ₂	50mM
Glycerin	15% (v/v)
pH5,8 (0,2M HOAc)	
sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren	

TfbII

MOPS	10mM
RbCl	10mM
CaCl ₂	75mM
Glycerin	15% (v/v)
pH6,5 (KOH)	
sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren	

10x TE-Puffer

TRIS/HCl	0,1M
EDTA	0,01mM
pH 7,5	

1x TE/Lithiumacetat/PEG-Puffer

10x TE-Puffer	10% (v/v)
10x Lithiumacetat-Puffer	10% (v/v)
PEG 4000	80% (v/v)

LiSORB

10x LiOAc-Puffer	10% (v/v)
10x TE-Puffer	10% (v/v)
Sorbitol	1M

4.5.9.2 Transformation von Hefezellen durch Elektroporation

50ml einer Hefekultur wurden bei einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5 durch 5minütiges Abzentrifugieren bei 3000rpm geerntet. Die Zellen wurden mit 50ml H₂O und anschließend mit 10ml eiskaltem 1M Sorbitol gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100µl 1M Sorbitol resuspendiert. 50µl der Zellsuspension wurden in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und mit etwa 5µl der zu transformierenden DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,5kV, 25µF und 200Ω. Die Zeitkonstante sollte zwischen 4,2 und 4,9 liegen. Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1ml eiskaltem 1M Sorbitol aufgenommen und auf entsprechend den Auxotrophie-markern supplementierte CM-Platten ausplattiert.

4.5.10 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Erlich, 1989, Innis *et al.*, 1990)

Diese Methode ermöglicht die Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz aus einem als Template dienenden doppelsträngigen DNA-Fragment. Dabei wurde die doppelsträngige DNA zunächst bei 95°C in einzelsträngige DNA aufgetrennt, bevor im Annealingschritt bei 42-60°C die Primer an die DNA-Stränge hybridisiert wurden. Im Elongationsschritt wurde das Primer-DNA-Fragment in 5'-3'-Richtung durch Taq- oder High-Fidelity-Polymerase verlängert. Durch die mehrfache Wiederholung der einzelnen Schritte konnte die Menge der gewünschten DNA-Sequenz exponentiell vermehrt werden.

Standard-PCR-Ansatz

Primer 1 und 2	je 100pmol
Template-DNA	ca. 100ng
MgSO ₄	1,5mM
dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Stammlösung je 25mM)	je 0,4µl
Taq- oder Vent-Polymerase (1U/µl)	1µl
evtl. DMSO	5µl
PCR-Puffer + Mg ²⁺	5µl
H ₂ O	ad 50µl

Bei Verwendung eines PCR-Gerätes ohne Heizdeckel wurde der Ansatz mit 50µl Paraffinöl überschichtet, um Flüssigkeitsverlusten entgegenzuwirken. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen wurde die Polymerase erst nach 2min Denaturierung bei 95°C zugegeben („Hot-Start“). Es wurden 20-30 Zyklen durchgeführt, die aus den folgenden Schritten bestanden:

<u>Phase</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
Denaturierung	95°C	30sec - 2min
Annealing	42-60°C je nach GC-Gehalt der Primer	30sec - 2min
Elongation	72°C	1-3min

Abschließend erfolgte ein 7minütiger Elongationsschritt bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

4.5.11 Rekombination von PCR-Fragmenten in den TOPO[®]-Vektor

Mithilfe des TOPO TA Cloning[®] Kits konnten PCR-Fragmente direkt aus dem PCR-Ansatz oder nach Extraktion aus einem Agarose-Gel in den TOPO[®] pCR2.1- oder pCRII-Vektor eingesetzt und in *E. coli* transformiert werden. Der Ansatz der TOPO[®] Klonierungsreaktion und die Transformation erfolgten entsprechend der Vorschrift des Herstellers.

4.5.12 Southern Blot-Analyse

4.5.12.1 Herstellung der Sonden-DNA

10µl der geextrahierten und denaturierten DNA wurden in einem Reaktionsansatz von 20µl mit 2µl 10x Hexanucleotid-Mix und 2µl 10x dNTP-Labelling Mix sowie 1µl (2U)

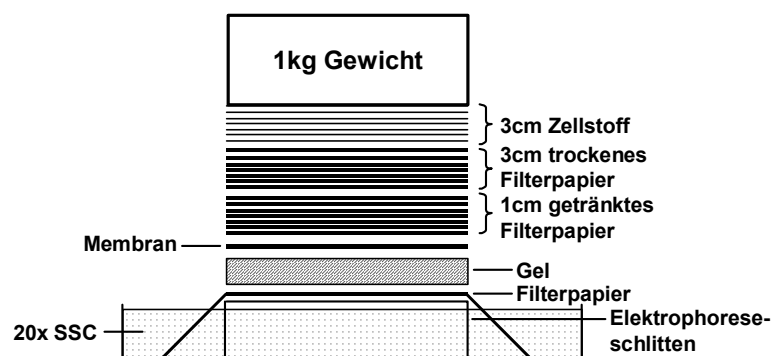
Klenow-Enzym versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2µl 0,2M EDTA pH8,0 wurde die Labeling-Reaktion gestoppt. Die DNA wurde durch Zugabe von 2,5µl 4M LiCl und 75µl EtOH (-20°C) und 1h Inkubation bei -70°C präzipitiert. Nach 10min Zentrifugation wurde die DNA mit 40µl 70% EtOH (-20°C) gewaschen, erneut 10min zentrifugiert und 5min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in 50µl 10mM TRIS/HCl, 1mM EDTA, pH8,0 durch 30min Vortexen bei 37°C gelöst. Das erfolgreiche Labeln konnte durch Aufbringen der Sonden-DNA auf eine Membran, anschließende Prähybridisierung, Hybridisierung, Farbreaktion und Vergleich mit einer gelabelten Kontroll-DNA überprüft werden.

4.5.12.2 Agarose-Gelelektrophorese für Southern Blot

Die über Nacht verdaute cDNA wurde auf ein 0,8%iges Agarose-Gel aufgetragen, und bei 120V der Elektrophorese unterzogen. Anschließend wurde das Gel neben einem Lineal, dessen Nullmarkierung auf Höhe der Slots angelegt wurde, auf dem UV-Tisch fotografiert.

4.5.12.3 Transfer der DNA auf eine Membran

Das Gel wurde 2x15min in Denaturierungspuffer und anschließend 2x15min in 20x SSC inkubiert. Der Kapillarblot wurde entsprechend der nachstehenden Zeichnung vorbereitet und die DNA mittels 20x SSC auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Es wurde mindestens 24h geblottet, wobei der Whatmanpapier-Stapel gegebenenfalls durch trockenes Whatmanpapier ersetzt wurde. Durch 5min Bestrahlen mit UV-Licht wurde die DNA auf der Membran fixiert.



Denaturierungspuffer

NaOH	0,5M
NaCl	1,5M

20x SSC

NaCl	3M
Na ₃ -citrat-2-hydrat	0,3M
pH7,0 (HCl)	

4.5.12.4 Prähybridisierung/Hybridisierung

Zur Entfernung von Salzen wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen. Zur Prähybridisierung wurde die Membran 1,5h in einer Hybridisierungsröhre im Drehrohrofen bei 68°C in Hybridmix inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 68°C im Drehrohrofen in Hybridmix mit frisch denaturierter Sonden-DNA, die etwa 1:600 zugegeben wurde.

Hybridmix

20x SSC	25% (v/v)
SDS	0,02%
N-Lauroylsarkosin, Na-Salz	0,1%
Blocking Reagenz	0,5%

Blocking Reagenz in verdünntem 20x SSC aufkochen, dann erst N-Lauroylsarkosin und SDS zugeben.

4.5.12.5 Detektion

Die Membran wurde 2x5min in Waschpuffer 1 (1ml/cm² Membran) bei RT , anschließend 2x15min bei 68°C in Waschpuffer 2 gewaschen. Nach 1min Waschen in Maleinsäure-Puffer wurde die Membran 30min in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran 30min in 150mU/ml Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat in Blockierungslösung (20ml/100cm² Membranfläche) inkubiert. Ungebundenes Antikörper-Konjugat wurde durch 2x15min Waschen mit 100ml Maleinsäure-Puffer entfernt. Die Membran wurde 2min in 20ml Puffer 3 äquilibriert, bevor sie mit 10ml der frisch zubereiteten Farblösung überschichtet, mit Folie abgedeckt und im Dunkeln bis zu 16h inkubiert wurde. Die Farbreaktion wurde durch 5min Waschen in Puffer 4 gestoppt.

Waschpuffer 1

20x SSC	10% (v/v)
SDS	0,1%

Waschpuffer 2

20x SSC	0,5% (v/v)
SDS	0,1%

Maleinsäure-Puffer

Maleinsäure	100mM
NaCl	150mM
pH7,5 (NaOH konz.), steril	

10x Blockierungslösung

10% Blockierungs-Reagens in Maleinsäurepuffer unter Erhitzen lösen, autoklavieren und bei -20°C aufbewahren. Zur Verwendung 1:10 mit sterilem Maleinsäure-Puffer verdünnen.

Puffer 3

TRIS/HCl	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	50mM
pH9,5	

Farblösung

NBT-Lösung	45µl
X-phosphate-Lösung	35µl
Agar	1%
in 10ml Puffer 3	

Puffer 4

TRIS/HCl	10mM
EDTA	1mM
pH8,0	

4.6 Zellbiologische Methoden

4.6.1 Kultur von *E. coli*-Zellen

Bis zu 20ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln (180rpm) inkubiert. Größere Ansätze wurden mit Vorkulturen angeimpft.

4.6.2 Kultur von *S. cerevisiae*-Zellen

Bis zu 4ml Flüssigmedium wurden in einem Reagenzglas mit Hefezellen angeimpft und bei 28°C unter Schütteln etwa 24h inkubiert. Diese Kultur wurde entweder direkt verwendet oder diente als Vorkultur zum Animpfen von Hauptkulturen. Das Wachstum der *S. cerevisiae*-Zellen wurde durch die Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Eine OD von 1,0 entspricht etwa 3×10^7 Zellen/ml.

4.6.3 Pulse Chase für ER-Degradation von CPY* und CTG*

10OD Zellen einer CM-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 wurden durch 2min Abzentrifugieren bei 2000rpm geerntet und 3x mit 1ml Labelling-Medium gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit der Pipette vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 1ml Labelling-Medium resuspendiert und 50min unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Gleichzeitig wurden 5ml Chase-Medium zum Vorwärmen mitinkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 250µCi ³⁵S-Methionin/Cystein gelabelt und weitere 20min bei 30°C inkubiert. Dann wurde der Chase durch Zugabe von 1ml Chase-Medium initiiert. Sofort wurden für die Nullprobe 450µl Zellen entnommen und auf 50µl eisgekühlte 110% TCA in konische Schraubdeckeltubes pipettiert. Die Chase-Kulturen wurden weiter bei 30°C inkubiert, wobei weitere Proben nach 20, 40 und 60min entnommen wurden. Die gesammelten Proben wurden 8min abzentrifugiert und der Überstand vollständig abpipettiert. Nach Zugabe von 1ml eisgekühlten Acetons und kurzem Vortexen wurden die Proben 5min zentrifugiert, und der Überstand wurde vollständig abpipettiert. Es wurden 60µl Glasperlen und 100µl BB1 zugegeben. Die Proben wurden 1min bei 95°C inkubiert und anschließend 1min gevortext. Das Erhitzen und Vortexen wurde noch 4x wiederholt, bevor die Proben kurz auf Eis gekühlt wurden. Nachdem die Flüssigkeitströpfchen in den Deckeln durch kurzes Zentrifugieren entfernt wurden, wurde den Proben Complete

Protease-Inhibitoren-Mix und 1ml IP-Puffer zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden bei 95°C aufgetaut und 15min abzentrifugiert. 970µl Überstand wurden in ein neues Schnappdeckeltube überführt und mit 5µl anti-CPY-Antikörper versetzt. Die Proben wurden bei RT 1h im Rotationsinkubator geschüttelt. Anschließend wurden 80µl einer Protein A-Sepharose-Suspension (70mg/ml) in IP-Puffer ohne Triton X-100 zugegeben und die Proben erneut 1h im Rotationsinkubator inkubiert. Die immunpräzipitierten Komplexe wurden 1min bei 2000rpm abzentrifugiert, und der Überstand wurde vollständig abgenommen. Die Sepharosepellets wurden 3x mit IP-Puffer gewaschen, bevor sie in 60µl Harnstoffpuffer aufgenommen wurden. Von den Proben wurden je 15µl auf ein 1mm dickes 7,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 150V durchgeführt, und die Gele wurden auf Filterpapier im Gelrockner 1h bei 75°C getrocknet. Über Nacht wurde ein Kodak-Biomax-Film bzw. ein Phosphorfluoroimager-Screen aufgelegt.

Labelling-Medium (1l)

Yeast Nitrogen Base w/o AS and AA	1,7g	Leucin	30mg
Glukose	1g	Lysin	30mg
Adenin (nicht Sulfatsalz)	20mg	Phenylalanin	50mg
Uracil	20mg	Glutamat	100mg
Tryptophan	20mg	Aspartat	100mg
Histidin	20mg	Valin	150mg
Arginin	30mg	Threonin	200mg
Tyrosin	30mg	Serin	400mg

pH6,0

sterilfiltrieren

Das Labelling-Medium darf keine Sulfatsalze enthalten.

Chase-Medium

Methionin	6mg/ml
BSA	2mg/ml
in Labelling-Medium	

BB1 (Breaking Buffer)

TRIS/HCl pH7,5	50mM
Harnstoff	6M
SDS	1%
EDTA	1mM
Bromphenolblau	einige Kristalle

IP-Puffer

TRIS/HCl pH7,5	50mM
Triton X-100	1,25% (v/v)
EDTA	6mM
NaCl	190mM

Harnstoff-Puffer

Harnstoff	8M
Tris/HCl	200mM
EDTA	0,1M
SDS	5%
Bromphenolblau	0,03%
DTT (frisch dazugeben)	1,5%

4.6.4 Pulse Chase-Analyse der proteasomalen Maturierung**4.6.4.1 Pulse Chase**

200D Zellen einer CM-Kultur mit einer OD von 0,7-1,0 wurden durch 2min Abzentrifugieren bei 2000rpm geerntet und 1x mit 0,8ml Labelling-Medium, das auf 30°C vorgewärmt wurde, gewaschen. Danach wurde der Überstand mit der Pipette vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 600µl Labelling-Medium resuspendiert, in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 10min auf dem Multivortexer bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 250µCi ³⁵S-Methionin/Cystein und 5min Inkubation bei 30°C auf dem Multivortexer gelabelt. Dann wurde der Chase durch Zugabe von 400µl Chase-Medium (für 4 Chase-Punkte) initiiert. Sofort wurden für die Nullprobe 100µl Zellen entnommen, auf eisgekühlten Lysepuffer mit SDS (260µl mit 0,4% SDS für Ump1HA, 500µl mit 0,2% SDS für Pre2HA) und 200µl (Ump1HA) bzw. 400µl (Pre2HA) Glasperlen in Safe lock-Eppendorf-Reaktionsgefäßen pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Chase-Kulturen wurden weiter bei 30°C auf dem Multivortexer inkubiert, wobei weitere Proben nach 10, 20 und 30min entnommen wurden.

4.6.4.2 Immunpräzipitation

Die Zellen wurden durch 3x 3min Vortexen aufgeschlossen, dabei wurden die Proben zwischendurch jeweils 3min auf Eis gekühlt. Für die Immunpräzipitation von Ump1HA wurden die Proben anschließend 5min bei 100°C inkubiert. Nach 10min Abzentrifugieren bei 4°C wurde von jeder Probe die gleiche Menge Überstand (Ump1HA: 220µl, Pre2HA: 380µl) in ein neues Tube überführt, in dem HA-Antikörper (Babco, Klon 16B12) in Lysepuffer ohne SDS (Ump1HA: 1,1ml, Pre2HA: 500µl) vorgelegt war, so dass das Verhältnis Antikörper:Gesamtvolumen der Probe 1:150 betrug. Die SDS-Konzentration in der gesamten Probe muss hierbei weniger als 0,1% betragen. Die Proben wurden nach gründlichem Mischen über Nacht auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 40µl einer Protein A-Sepharose-Suspension (100mg/ml in Lysepuffer ohne TritonX-100) wurden die Proben 3-4h bei 4°C auf einem Rotationsinkubator inkubiert. Durch 1min Zentrifugation bei 2000rpm wurden die immunpräzipitierten Komplexe sedimentiert und 3x mit 0,8ml Waschpuffer gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 30µl 2x Laemmli mit 0,4% β-Mercaptoethanol aufgenommen. Nachdem die Proben 3min bei 95°C erhitzt wurden, wurden sie kurz abzentrifugiert. 25µl der Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 10min in Fixierer und 30min in Amplify[®] inkubiert, bevor sie auf Filterpapier im Gelrockner getrocknet wurden. Ein Phosphorfluoroimager-Screen wurde für 3-4 Tage, ein Kodak-Biomax-Film für 2-3 Wochen aufgelegt.

Labelling-Medium

2x CM-Medium ohne Methionin (vgl. 3.1.7.1), sterilfiltriert

Chase-Medium

Labelling-Medium (s.o.)

Methionin 6mg/ml

BSA 2mg/ml

Lysepuffer

Hepes pH7,5 50mM

EDTA 5mM

NaCl 0,15M

Triton X-100 1% (v/v)

N-Ethylmaleimid (NEM) 10mM

Complete Protease-Inhibitor

Waschpuffer

Hepes pH7,5 50mM

EDTA 5mM

NaCl 0,15M

Triton X-100 1% (v/v)

SDS 0,1%

Fixierer

MeOH 20% (v/v)

HOAc 10% (v/v)

4.6.5 Sporulation

Die Transformantenkolonien wurden mit je 1 ml GNA von den Platten gewaschen und zu jeweils etwa 30 000 Transformanten auf 50 ml GNA gepoolt. Bei RT wurden die Ansätze unter Schütteln 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2500 Upm 10 min abzentrifugiert, mit je 20 ml sterilem H₂O gewaschen, nochmals abzentrifugiert und in je 50 ml 1%iger KOAc-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden 6 d bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Die Kontrolle der Sporulation erfolgte mikroskopisch.

GNA

Yeast-Extract 1%

Nutrient Broth 3%

Glucose 3%

pH5,5

4.6.6 Zellfraktionierung

1l einer YPD-Kultur einer OD₆₀₀ von 1-2 wurde 5min bei 2500rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit 5ml eiskaltem H₂O gewaschen. Durch Auswiegen wurde das Zellvolumen näherungsweise bestimmt, indem eine Dichte von 1 angenommen wurde. Die Zellen wurden im dreifachen Volumen eiskaltem H₂O resuspendiert und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in je einem Volumen Sphäroplastenpuffer gewaschen und dann im dreifachen Volumen Sphäroplastenpuffer resuspendiert. Von nun an durften die Zellen nicht mehr gevortext werden. Zu der Zellsuspension wurden 5mg/ml (bezogen auf das eingesetzte Zellvolumen) Zymolyase 20T und 30mM DTT zugegeben. Die Zellen wurden unter gelegentlichem Schwenken 1h bei 30°C inkubiert. Die Sphäroplastierung wurde mikroskopisch überprüft. Dazu wurde ein großer Wassertropfen auf einen Objektträger gesetzt und mit einem kleinen Tropfen der Zellsuspension vermischt. Dadurch platzen sphäroplastisierte Zellen und erscheinen unter dem Mikroskop durchsichtig. Nach vollständiger Sphäroplastierung wurden die Sphäroplasten dreimal mit eiskaltem Sphäroplastenpuffer gewaschen und jeweils bei 1500g abzentrifugiert. Danach wurden sie in dem 10fachen Zellvolumen PB + 15% (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach der Zugabe von PMSF (1:500) wurden die Sphäroplasten durch 20maliges Auf- und Abbewegen eines Douncers aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht lysierte Sphäroplasten wurden durch 10min Zentrifugation bei 5000rpm und 4°C abgetrennt. Anschließend erfolgte die Fraktionierung des Überstandes durch 1h Zentrifugation bei 20000rpm und 4°C. Das Pellet enthielt die Zellkerne und wurde nach der Resuspension in PB mit 100µM ALDI (Cbz-Ile-Glu-(O-t-Bu)-Ala-Leucinal) und 0,1% Triton X-100 in Gegenwart von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben. Nach dem Auftauen in Gegenwart von 20µg/ml DNase I-EP wurde das Kern/rER-Extrakt durch 10 min Zentrifugation bei 20 000g und 4°C erhalten.

Sphäroplasten-Puffer

TRIS/HCl, pH7,5	50mM
MgCl ₂	10mM
Sorbitol	1M

4.6.7 *In situ*-Aktivitätstest (nach Wolf und Fink, 1975)

Auf Vollmedium-Platten gewachsene Hefekolonien werden auf mit Rundfilter ausgelegte Agar-Platten überstempelt und 1-3d inkubiert. Das mit Hefekolonien bewachsene Filterpapier wird in eine Glas-Petrischale überführt, die zuvor mit einer 1%igen Agarlösung beschichtet wurde. Durch Überschichtung des Filters mit 10ml Chloroform und 15min Inkubation werden die Membranen permeabilisiert. Nach dem Entfernen des Chloroforms wird der Filter getrocknet und wieder in eine mit 1%iger Agarlösung beschichtete Glas-Petrischale überführt. Die Hefekolonien werden mit der Substratlösung übergossen und 3-4h bei 37°C inkubiert. Das durch Protease-Positive Kolonien freigesetzte Fluorophor β -Naphthylamin kann bereits nach 2h unter UV-Licht (366nm) sichtbar gemacht werden. Die Protease-Aktivität kann durch 10-30min Überschichten des Filters mit Fast Garnet-Lösung als Rotfärbung visualisiert werden.

Substratlösung

TRIS/HCl, pH8,2	50mM
Agar	1%
Cbz-Leu-Leu-Glu- β NA-Stammlösung (50mM in DMSO)	1% (v/v)

Agar in Puffer schmelzen, auf 42°C abkühlen lassen und Substratlösung zugeben.

Fast Garnet-Lösung

Fast Garnet GBC-Salz	5mg
DMSO	0,1ml
0,1M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH5	10ml

Fast Garnet-Salz in DMSO lösen und zu Phosphatpuffer geben.

4.6.8 Test auf Temperatursensitivität

Für den Test auf Temperatursensitivität werden Zellen auf Platten ausgestrichen oder als Verdünnungsreihen aufgetropft, von denen eine bis zum Hochwachsen der Hefekolonien bei 28°C, die andere über den gleichen Zeitraum bei 37°C inkubiert wird. Die Aufnahme von Wachstumskurven bei verschiedenen Temperaturen ermöglicht das Erkennen geringer Temperatursensitivitäten. Dazu lässt man Hefe-Kulturen in Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 28°C unter Schütteln anwachsen. Mit frischem Medium werden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Anschließend

werden die Kulturen unter Schütteln bei 28°C bzw. 37°C inkubiert, wobei über einen Zeitraum von 10-12h stündlich die Zelldichte über die OD₆₀₀ bestimmt wird.

4.6.9 Test auf Bleomycin/Zeocin-Hypersensitivität

Der Test auf Bleomycin- bzw. Zeocin-Hypersensitivität erfolgt durch Auftüpfeln der Zellen auf YPD-Platten, auf die zuvor unterschiedliche Mengen Bleomycin bzw. Zeocin ausplattiert wurden. Dazu wurden logarithmisch wachsende Flüssigkulturen mehrfach jeweils 1:10 verdünnt. Von den Verdünnungen wurden je 4µl als Verdünnungsreihe auf die Platten aufgetropft. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert. Es wurden folgende Konzentrationen, bezogen auf das Agar-Volumen, eingesetzt (Moore, 1991; Evans Febres *et al.*, 2001):

Bleomycin	30µg/ml	40µg/ml	
Zeocin	50µg/ml	150µg/ml	250µg/ml

4.6.10 Test auf Canavanin-Sensitivität

Zum Test auf Canavanin-Sensitivität wurden CM-Platten hergestellt, die anstelle von Arginin Canavanin in den Konzentrationen von 0,2µg/ml, 0,4µg/ml und 0,6µg/ml enthielten. Die Zellen wurden in Verdünnungsreihen aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei 28°C.

4.6.11 Halotest auf H₂O₂-Sensitivität

Stationäre Kulturen aus in YPD angewachsenen Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen wurden mit 0,5% Agar in YPD (40°C) gemischt und auf YPD-Platten gegossen. Whatman 003-Papierscheibchen wurden mit 10µl 30% H₂O₂ getränkt und auf die Oberfläche der erstarrten Platten aufgebracht. Die Formation der Halonen wurde nach 2d Wachstum bei 28°C aufgenommen. Der Radius der Halonen und das Einwachsen der Kolonien in den zunächst entstandenen Hof sind ein Maß für den Grad der H₂O₂-Sensitivität der Zellen (Ligr *et al.*, 2001).

4.6.12 Direkte Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten mithilfe eines Mikroskops (Modell DMR, Leica, Bensheim) mit Quecksilberdampf-Lampe (HBO 50W, Osram) und einem $\times 100/1.4$ Öl-Immersionsobjektiv (PL Fluostar). Die GFP-Fluoreszenz wurde über den FITC-Kanal bei einer Anregungswellenlänge von 490nm und einer Emissionswellenlänge von 510/540nm beobachtet. Die Zellen wurden mithilfe der Nomarski-Optik, die DAPI-Färbung der Zellkerne mithilfe des UV-Kanals visualisiert. Die Aufnahmen erfolgten über eine gekühlte Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (Modell C 5985-10, Hamamatsu, Hersching).

Für die DAPI-Färbung der Zellkerne wurden die Zellen kurz in 30% Methanol gewaschen und 5min in 50ng/ml DAPI in PBS inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS.

10×PBS

Na ₂ H-orthophosphat·2H ₂ O	0,8M
NaH ₂ -orthophosphat·H ₂ O	0,2M
NaCl	1M

4.6.13 Überexpressionsstudien

Zur Untersuchung der Galaktose-induzierten Überexpression auf Platten wurden die zu untersuchenden Stämme in 1:10-Verdünnungsreihen auf Platten aufgetropft, die entweder Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle enthielten. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 28°C.

Die Untersuchung der Galaktose-induzierten Überexpression in Flüssigkulturen erfolgte durch Umsetzen von frühlogarithmischen, in Glukose-haltigem Medium angewachsenen Kulturen in Galaktose-haltiges Medium und weitere 2-4h Inkubation unter Schütteln bei 28°C.

4.7 Proteinchemische Methoden

4.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen erfolgte mithilfe des „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ („Bradford“) von BioRad nach Anleitung des Herstellers. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet. Die Bestimmung der OD erfolgte bei 595nm in Küvetten im Ultraspec III-Photometer von Pharmacia.

4.7.2 Proteinfällungen

4.7.2.1 TCA-Fällung

Die Proben wurden durch Zugabe von 1/5 Vol. einer 50%igen TCA-Lösung gefällt, 20min auf Eis inkubiert und anschließend 30min bei 14000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde 1× mit eiskaltem Aceton gewaschen und in Laemmli-Puffer aufgenommen.

4.7.2.2 NaDOC-Fällung

Die Proben wurden durch Zugabe von 1/10 Vol. einer 72%igen TCA-Lösung und 1/10 Vol. einer 0,15%igen NaDOC-Lösung gefällt. Nach 15min Inkubation bei RT wurden die Proben 15min bei 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet 1× mit eiskaltem Aceton gewaschen und in Laemmli-Puffer aufgenommen.

4.7.3 Zellaufschlüsse

4.7.3.1 Alkalische Lyse (Schatzaufschluss)

1,5ml einer stationären Hefekultur wurden bei 3500rpm 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1ml H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 160µl 1,85M NaOH und 85µl β-Mercaptoethanol wurden die Zellen 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 160µl 50% TCA zugegeben und die Mischung wurde erneut 10min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden 3min abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 50-150µl 1x Laemmli aufgenommen. Mit ungepuffertem 0,5M TRIS wurde der pH-Wert so eingestellt, dass

der Puffer nach Blau umschlug. Die Proben wurden 4min bei 95°C aufgeköcht, unlösliches Material wurde anschließend abzentrifugiert.

4.7.3.2 Glasperlenaufschluss

300µl Hefezellen wurden mit der gleichen Menge Glasperlen (Ø 0,5mm, Sigma) versetzt und mit kaltem Lysepuffer auf 1ml aufgefüllt. Die Zellen wurden dreimal 3min auf einem Vortexer geschüttelt und zwischendurch auf Eis gestellt. Danach wurde 5 min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und frisch verwendet.

4.7.3.3 Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff

Die Zellen wurden 5min bei 6000rpm abzentrifugiert und 1x mit H₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde 1:1 (w:v) in PB + 10% Glycerin + 0,1% Triton X-100 resuspendiert. Anschließend wurden 1mM PMSF und eine DNase-Lösung (2% in 50mM TRIS/HCl, pH7,5, 2mM MgCl₂) 1:2000 zugesetzt. Die Zellen wurden in einer vorgekühlten Reibschale mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit dem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Nach dem Auftauen wurden die Zelltrümmer 15min bei 14000rpm und 4°C abzentrifugiert (SS-34-Rotor, Sorvall). Der Überstand wurde abgenommen, durch ein 0,45µm-Filter filtriert und sofort weiterverwendet.

PB-Puffer

TRIS/HCl, pH7,5	20mM
NaCl	150mM

4.7.3.4 Zellaufschluss mithilfe der French Press

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen wurden in etwa dem zweifachen Volumen PB-Puffer + 10% (v/v) Glycerin unter Zusatz von 1mM PMSF und DNase (1:2000; 2% in 50mM TRIS/HCl, pH7,5, 2mM MgCl₂) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimalige Anwendung eines Drucks von 1000psi in einer French[®] Pressure Cell Press von SLM-AMINCO nach Anweisung des Herstellers. Anschließend wurden die Lysate wie nach einem Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff weiterbehandelt.

4.7.4 Isolierung proteasomaler Komplexe

Die affinitätschromatographische Isolierung proteasomaler Komplexe erfolgte über Protein A-markierte proteasomale Untereinheiten und IgG-Sepharose. Dazu wurde zu dem durch den Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff gewonnenen Zelllysats mit HOAc, pH3 und PB-Puffer gewaschene IgG-Sepharose in einem Falcon-Tube zugegeben. Das Tube wurde auf einem Rollierer bei 4°C bis zu 1h inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Chromatographie-Säule überführt und nach dem Durchlaufen der Flüssigkeit 3× mit PB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Komplexe mit 3× 1ml HOAc, pH3 eluiert. Zur Fällung der eluierten Proteine wurde das Eluat mit 1/10 Volumen 72% TCA und 1/10 Volumen 0,15% DOC versetzt. Nach 15min Inkubation bei RT und 15min Zentrifugation bei 14000rpm wurde das Pellet mit 1ml Aceton gewaschen. Nach erneutem 5min Abzentrifugieren bei 14000rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Regenerierung der IgG-Sepharose erfolgte durch Waschen mit HOAc, pH3 und Äquilibrieren mit PB-Puffer. Die IgG-Sepharose wurde mit PB-Puffer überschichtet aufbewahrt.

HOAc, pH3
 HOAc, pH3 0,5M
 pH mit NH₄OAc einstellen

4.7.5 Isolierung nativer proteasomaler Komplexe

Die affinitätschromatographische Isolierung nativer proteasomaler Komplexe erfolgte über Strep-markierte proteasomale Untereinheiten und eine Streptactin-Matrix. Dazu wurde der Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff und Puffer W unter Zugabe von 2mM ATP durchgeführt. Zur Isolation von 20S-Proteasomen wurde das erhaltene Lysat mit 1U/ml Apyrase versetzt und 15min bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde mit 40µg/ml Avidin (Stammlösung 5mg/ml) versetzt, mit ungepuffertem 0,5M Tris auf pH8 eingestellt und 30min bei 4°C auf einem Rollierer inkubiert. Nach der Zugabe der mit Puffer W äquilibrierten Streptactin-Matrix wurde der Ansatz 1h bei 4°C auf einem Rollierer inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Chromatographie-Säule überführt und 5× mit je 1ml Puffer W gewaschen. Die gebundenen Komplexe wurden mit 6× 0,5ml Puffer E eluiert. Die Eluate ließen sich mithilfe eines Centricons 100

durch Zentrifugation bei 4°C aufkonzentrieren. Die Streptactin-Matrices konnten durch Waschen mit Puffer R und Äquilibrieren mit Puffer W regeneriert und mit Puffer W überschichtet aufbewahrt werden.

Puffer W

Tris/HCl, pH8,0	100mM
EDTA	1mM

Puffer E

Puffer W

Desthiobiotin	5mM
---------------	-----

Puffer R

Puffer W

HABA	1mM
------	-----

4.7.6 Isolierung des Proteins Blm3

Die Isolierung von Blm3 erfolgte aus 2l einer spätlogarithmischen YPD-Kultur des Stammes WCGa Pre6-ProA. Nach dem oben beschriebenen Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff wurde das Lysat auf pH8,0 eingestellt. Dann wurde zur Dissoziation des 26S-Komplexes in 19S- und 20S-Komplex 1U/ml Apyrase zugegeben und das Lysat 15min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe der IgG-Sepharose wurde der Ansatz 4h bei 4°C auf dem Rollierer inkubiert. Die IgG-Sepharose wurde 3× mit je 50ml PB-Puffer gewaschen. Die Elution des Proteins Blm3 von gebundenem 20S-Proteasom erfolgte durch Elution mit 10ml 0,6M NaCl. Reste des Proteins Blm3 wurden mit 1M NaCl von der Säule eluiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation in Centricon 100-Röhrchen bei 4°C aufkonzentriert und mit PB-Puffer umgepuffert.

4.7.7 Glycerin-Dichtegradienten

Aus 10%igem und 40%igem (v/v) Glycerin/PB-Puffer wurden mithilfe eines Gradientenmischers 10-40%ige Glycerin-Dichtegradienten hergestellt, indem der 40%ige Puffer in die der Ausflussöffnung benachbarte, der 10%ige Puffer in die von der Ausflussöffnung entferntere Kammer gefüllt wurde. Jeweils 800µl der Proben in PB + 10% (v/v) Glycerin wurden auf die Glycerin-Dichtegradienten (ca. 10ml) aufgetragen und in einem SW40-Rotor (Beckmann) 16h bei 40000rpm und 4°C ultrazentrifugiert.

Danach wurden von oben 600µl-Fractionen abgenommen und einem Aktivitätstest und/oder der Proteinfällung unterzogen.

4.7.8 *In vitro*-Aktivitätstest

Jeweils 100µl des Substratpuffers werden in eine Kavität einer schwarzen 96 Loch-Mikrotiterplatte gefüllt. Dazu werden 10µl der Probe gegeben, vorsichtig geschüttelt und 30min bei 37°C inkubiert. Je nach Abgangsgruppe werden zur Messung der Fluoreszenzemission folgende Wellenlängen gewählt:

<u>Substrat</u>	<u>Extinktion</u>	<u>Emission</u>
- βNA	355nm	405nm
- AMC	390nm	460nm

<u>Substratpuffer</u>	
TRIS/HCl, pH7,5	50mM
MgCl ₂	5mM
Substrat-Stammlösung	100µM

<u>Substrat-Stammlösung</u>	
Substrat (in DMSO oder DMF)	20mM

Folgende Substrate wurden verwendet:

<u>Substrat</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Aktivität</u>
Z-Gly-Gly-Leu-AMC	Leu-Substrat	trypsinartige Aktivität
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Tyr-Substrat	chymotrypsinartige Aktivität
BZ-Val-Gly-Arg-AMC	Arg-Substrat	trypsinartige Aktivität
Z-Leu-Leu-Glu-βNA	Glu-Substrat	PGPH-Aktivität

4.7.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) in einer BioRad Mini ProteanII®-Elektrophoresekammer durchgeführt. Es wurde mit 0,8mm dicken 5-15%igen Polyacrylamidgelen gearbeitet. 10-50µg Proteine wurden in einem Gesamtvolumen von 10-20µl mit einer entsprechenden Menge SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen 3min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 150V bis zum Austreten der Bromphenolblaubande

durchgeführt. Als Laufpuffer diente SDS-Puffer. Als Molekulargewichtsmarker wurde der SeeBlue Pre-Stained Standard®-Marker verwendet. Die SDS-Gele wurden geblottet oder mit Coomassie angefärbt.

SDS-Laufpuffer

Glycin	200mM
SDS	0,1%
TRIS	25mM
pH8,8	

SDS-PAGE-Probenpuffer (Laemmli-Puffer)

TRIS/HCl, pH6,8	50 mM
SDS	1%
Glycerin	12,5% (v/v)
DTT	125mM
Bromphenolblau	0,01%

Für nichtreduzierende Bedingungen wurde der Probenpuffer ohne DTT angesetzt.

Trenngele

Es wurden SDS-Polyacrylamidgele mit einem Acrylamidanteil von 5-15% verwendet, die entsprechend nachstehender Tabelle zubereitet wurden:

	5%	7,5%	10%	12%	15%
30% Acrylamid*	1,7 ml	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
H ₂ O	5,6 ml	4,9 ml	4,0 ml	3,5 ml	2,4 ml
1,5 M TRIS pH8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

*30% Acrylamid, Mix 37,5:1 (29,22% Acrylamid, 0,78% Bisacrylamid)

Sammelgel

H ₂ O	6,1ml
0,5M TRIS/HCl pH6,8	2,5ml
10% SDS	100µl
Acrylamid-Stocklösung (30%)	1,3ml
10% APS	50µl
TEMED	10µl

Coomassie

Coomassie (SERVA Blue R)	0,25%
Methanol	40%
Essigsäure	10%

Coomassie in Methanol über Nacht lösen, Essigsäure zugeben und die Lösung filtrieren.

4.7.10 Nichtdenaturierendes Gel (Nativgel)

Aus nachstehender Mischung wurde ein 1,5mm dickes 4%iges Polyacrylamidgel in 1x Nativgel-Elektrophoresepuffer polymerisiert:

5x Nativgel-Elektrophoresepuffer	3ml
Acrylamid-Stocklösung (30%)	2ml
ATP	1mM
DTT	1mM
10% APS	120µl
TEMED	12µl

Die Proben wurden in Nativgel-Probenpuffer aufgenommen und geladen. Anschließend wurde die Elektrophorese in kaltem 1x Nativgel-Elektrophoresepuffer bei 4°C und 150V etwa 2,5h durchgeführt, bis die Xylencyanolbande aus dem Gel austrat.

5x Nativgel-Elektrophoresepuffer

TRIS	0,45M
Borsäure	0,45M
MgCl ₂	10mM
pH 8,1-8,4	

1x Nativgel-Elektrophoresepuffer

5x Nativgel-Elektrophoresepuffer	20%
ATP	1mM
DTT	1mM

5x Nativgel-Probenpuffer

50% Glycerin mit einer Spatelspitze Xylencyanol

4.7.11 Natives Gradientengel

Für ein natives Gradientengel 3,5%-6% wurden die entsprechenden Lösungen so in den Gradientenmischer eingefüllt, dass sich die Mischung für das 6%ige Gel in der Kammer befindet, an der der Auslauf angebracht ist. Die Mischung für das 3,5%ige Gel wurde in die vom Auslauf entferntere Kammer gefüllt. Es wurde ein 1,5mm dickes Gel gegossen. Die Elektrophorese erfolgte analog dem einfachen Nativgel.

3,5%iges Nativgel

H ₂ O	3,7ml
Nativpuffer 5x	1,1ml
Acrylamid (30%)	641µl
ATP	1mM
DTT	1mM
10% APS	27µl
TEMED	2,7µl

6%iges Nativgel

H ₂ O	1,7ml
Glycerin	1,5ml
Nativpuffer 5x	1,1ml
Acrylamid (30%)	1,1ml
ATP	1mM
DTT	1mM
10% APS	27µl
TEMED	2,2µl

4.7.12 Auftrennung von Nativgel-Banden mithilfe der SDS-PAGE

Mithilfe eines Phosphorfluoro-Imagers wurde die Lage von Nativgel-Banden GFP-markierter Proteine unter Zuhilfenahme eines fluoreszierenden Lineals bestimmt. Die interessierenden Nativgel-Banden wurden ausgeschnitten und 30min unter Schütteln in 0,5M β -Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend wurde die ausgeschnittene Bande in eine Tasche eines SDS-Polyacrylamid-Gels überführt. Die Tasche wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte wie für SDS-PAGE beschrieben.

4.7.13 2D-Gelelektrophorese

4.7.13.1 1. Dimension (NEPHGE)

Etwa 70µg Protein wurden in 75µl 2D-Probenpuffer aufgenommen und über Nacht in einem mit Parafilm® abgedichteten Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur auf dem Vortexer geschüttelt. Die Glasröhrchen (15cm lang, Ø innen 2,5mm) wurden unten mit Parafilm® verschlossen und auf einer Höhe von 12 cm markiert. Das NEPHGE-Gel wurde unter leichtem Erwärmen zubereitet. Die Lösung wurde filtriert (0,2µm) und entgast. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Acrylamidmischung mithilfe

einer Spritze mit feiner Nadel (0,7 x 130mm) bis zur Markierung luftblasenfrei in die Glasröhrchen gegossen. Durch vorsichtiges Klopfen wurden eingeschlossene Luftbläschen entfernt. Die Gele wurden mit 20µl des bei 37°C gelösten Übersichtungspuffers überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Übersichtungspuffer abgeschüttelt, und die Gelstäbe wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die obere Kammer (+ - Pol) wurde mit 0,01M H₃PO₄, die untere Kammer (- - Pol) mit 0,02M NaOH gefüllt. Die Elektrophorese wurde für 4h bei 400V durchgeführt. Mithilfe einer wassergefüllten Spritze mit dünner Nadel (0,45 x 89mm) wurde der Gelwurm aus der Glaskapillare herausgedrückt und 2x 20min unter Schütteln in Äquilibrationpuffer inkubiert.

Acrylamid-Stocklösung für NEPHGE

Acrylamid	28,38% (v/v)
Methylenbisacrylamid	1,62% (v/v)

In H₂O lösen und filtrieren.

NEPHGE-Gel

Harnstoff	9,2M
Acrylamid-Stocklösung für NEPHGE	13,2% (v/v)
Nonidet P-40	0,02% (v/v)
H ₂ O	0,2% (v/v)
Servalyt 3-10	5% (v/v)

10ml der Lösung reichten für etwa 8 Gelstäbchen. Zum Auspolymerisieren wurden 27µl 10% (w/v) APS (0,03%) und 19µl TEMED (0,2% (v/v)) zugegeben.

Überschichtungspuffer

Harnstoff	9M
Servalyt 3-10	2,5% (v/v)

Aliquotiert bei -20°C aufbewahren.

2D-Probenpuffer

Harnstoff	9,5M
Nonidet P-40	2% (v/v)
Servalyt 3-10	5% (v/v)
β -Mercaptoethanol	5% (v/v)
SDS	0,3%

Sterilfiltriert (0,2 μ m) aliquotieren (je 1ml) und bei -20°C aufbewahren. Aliquots bei 37°C auftauen.

NEPHGE Laufpuffer

NaOH	0,02M	(Kathode, - - Pol)
H ₃ PO ₄	0,01M	(Anode, + - Pol)

Es wurde jeweils 1l Laufpuffer benötigt.

Äquilibrationpuffer

Glycerin	10% (v/v)
β -Mercaptoethanol	10% (v/v)
SDS	2,3%
TRIS/HCl, pH8,8	90mM

Frisch ansetzen. Für 2 Gelstäbe wurden 50ml Äquilibrationpuffer angesetzt.

4.7.13.2 2. Dimension

Nachdem die Glasplatten und Spacer für die zweite Dimension mithilfe von Vaseline, dünnen Schläuchen und Klammern zusammengebaut wurden, wurde ein 12- oder 15%iges SDS-Polyacrylamidgel gegossen. Das Sammelgel wurde bis zur Unterkante der angeschrägten Flächen gegossen. Die Glasplatten mit dem Gel wurden in die Elektrophoreseapparatur eingebaut, und auf das auspolymerisierte Sammelgel wurde eine Schicht Agarosepuffer gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gelwurm auf den Agarosepuffer aufgelegt und mit Agarosepuffer überschichtet. Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer zuerst für 1,5h bei 100V, anschließend für 1200Vh durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie angefärbt.

Agarosepuffer

Glycerin	10% (v/v)
SDS	2,3%
TRIS/HCl, pH6,8	0,0625M
Agarose	1%
β -Mercaptoethanol	5% (v/v)
Bromphenolblau	0,05%

Frisch ansetzen. Zunächst wurde die Agarose in Wasser aufgeköcht. Verdampftes Wasser wurde ersetzt, bevor die anderen Komponenten hinzugefügt wurden. Bis zur Verwendung bei 58°C aufbewahren. Für 2 Gele wurden 25ml Agarosepuffer angesetzt.

4.7.14 Western Blot

4.7.14.1 Transfer auf eine Membran

Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert.

Nassblot

Auf die Anodenseite einer Nassblot-Halterung wurde ein in Blottingpuffer eingeweichtes Schwämmchen, gefolgt von drei eingeweichten Lagen Whatman-Papier, gelegt. Das Gel wurde auf die eingeweichte Membran überführt und ebenfalls auf die Halterung gelegt. Darauf folgen wieder drei Lagen eingeweichtes Whatman-Papier. Nach dem Entfernen der Luftblasen wird die Blothalterung in die Blotkammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Blottingpuffer bei 70V für 1h.

Semidry-Blot

Dazu wurden auf die Kathodenseite einer Semidry-Blottingapparatur nacheinander 4 Lagen mit Blottingpuffer getränktes Whatmanpapier von der Größe des Trenngels, das Gel, die ebenfalls getränkte Membran und nochmals 4 Lagen getränktes Blottingpapier gelegt. PVDF-Membran wurde zuerst kurz in Methanol eingetaucht, bevor sie in Blottingpuffer getränkt wurde. Vor dem Auflegen der Anode wurden die Luftblasen entfernt. Der Apparatedeckel wurde aufgeschraubt, anschließend wurde der Transfer der Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 400mA für 1h durchgeführt. Durch Anfärben der Nitrocellulosemembran mit Amidoblack konnte ein erfolgter Transfer kontrolliert werden. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Wasser abgewaschen.

Blottingpuffer

Glycin	100mM
SDS	0,1%
TRIS	12,5mM
MeOH	15% (v/v)
pH8,8	

Zum Transfer hochmolekularer Proteine wurde der Blottingpuffer mit 1% Methanol angesetzt.

Amidoblack

Amidoschwarz	0,1%
Methanol	45% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Nativgele wurden in 10mM Aminohexansäure auf PVDF-Membran geblottet.

4.7.14.2 Detektion mit dem ECL-System

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 15min bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Blot über Nacht bei 4°C oder 3h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper geschüttelt. Der Blot wurde 5x je 3min mit TST geschüttelt, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde der Blot mindestens 1h bei Raumtemperatur mit dem HRPO-konjugierten sekundären Antikörper geschüttelt. Die Verdünnungen der Antikörper sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
α -Blm3	1:200 (1,5% BSA/TST)	Rabbit anti-guinea pig	1:10 000 (1,5% BSA in TST)
α -Cim3/Rpt6	1:1000 (5% Milch)	Goat anti-rabbit	1:10 000 (5% Milch)
α -Cim5	1:1000 (5% Milch)	Goat anti-rabbit	1:10 000 (5% Milch)
α -CPY*	1:10000 (PBS-T)	Rabbit anti-mouse	1:10000 (PBS-T)
α -FBPase	1:5000 (1% Milch in TBS-T)	Goat anti-rabbit	1:10 000 (1% Milch in TBS-T)
α -GFP	1:1000 (5% Milch)	Rabbit anti-mouse	1:10 000 (5% Milch)
α -HA	1:1000 (5% Milch)	Rabbit anti-mouse	1:10 000 (5% Milch)
α -Pre2	1:1000 (5% Milch)	Goat anti-rabbit	1:10 000 (5% Milch)
α -Pre6	1:1000 (5% Milch)	Goat anti-rabbit	1:10 000 (5% Milch)

Nach 5x 3 min Waschen mit TST-Puffer wurde die Membran auf Zellstoff kurz getrocknet und 1min in ECL-Lösung inkubiert. Danach wurde ein ECL-Röntgenfilm auf die Membran gelegt und nach dem Belichten entwickelt.

TST

TRIS, pH7,5	0,03M
NaCl	0,15M
Tween [®] 20	0,1% (v/v)

PBS-T

Tween [®] 20 in 1x PBS	0,1% (v/v)
------------------------------------	------------

10x TBS-T

TRIS	0,2M
NaCl	1,4M
Tween [®] 20 pH7,6 (HCl)	1% (v/v)

ECL-Lösung

TRIS/HCl, pH8,5	100mM
p-Coumarinsäure	0,2%
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	0,5%
H ₂ O ₂	0,03% (v/v)

4.7.15 Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzierung von Blm3 wurde von Frau Dr. Regine Kraft (MDC, Berlin) durch tryptischen Verdau und nachfolgende massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Die Proteinspots der 2D-Gele wurden von Frau Dr. Sabine Baumgärtner mittels „Peptide Mass Finger Print“-Analyse durchgeführt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Vorarbeiten

In *S. cerevisiae* ist die Mehrzahl der Proteasomen in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert (Enenkel *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998). Über die Protein A-markierte α -Untereinheit Pre6/ α 4 lassen sich Hefe-Proteasomen aus Kern/ER-Extrakten durch Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose und saure Elution isolieren. Man erhält so ein Gemisch aus proteasomalen Komplexen verschiedener Assemblierungs- und Maturierungsstadien, dessen Zusammensetzung der Stabilität der einzelnen Formen entspricht. Die Hauptbestandteile auf diese Weise präparierter Proteasomen sind 20S- und 26S-Komplexe. Bei anschließender SDS-PAGE der so isolierten Proteasomen wurde neben dem für das 26S-Proteasom bekannten Bandenmuster eine substöchiometrische Bande bei etwas über 200kDa beobachtet (Abb. 11).

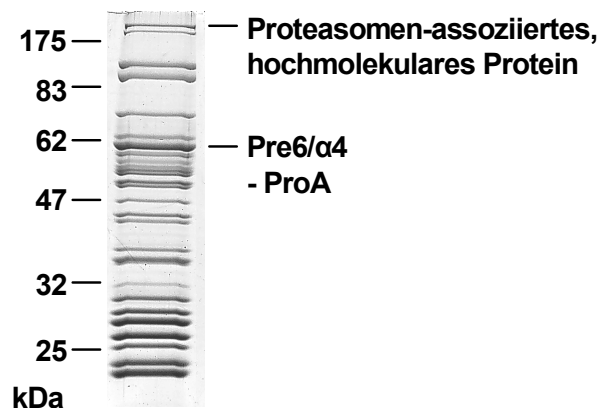


Abb. 11: Ein hochmolekulares Protein ist Bestandteil des affinitätsgereinigten Proteasoms

Über die Protein A-markierte α -Untereinheit Pre6/ α 4 wurden proteasomale Komplexe aus Kern/ER-Extrakten durch Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose und Elution mit HOAc, pH3, isoliert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. In der Coomassie-Färbung ist zusätzlich zu den Banden der proteasomalen Untereinheiten substöchiometrisch eine hochmolekulare Bande sichtbar, die ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau durch ESI-MS/MS-Analyse identifiziert wurde.

5.2 Identifizierung des Proteasomen-assoziierten Proteins

Zur Identifizierung wurde die dem Proteasomen-assoziierten hochmolekulare Protein entsprechende Bande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten. Nach Alkylierung mit Iodacetamid, tryptischem Verdau und Entsalzung wurde die Peptidmischung über ESI-MS/MS (Q-ToF, Micromass, Manchester UK) analysiert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnisse der ESI-MS/MS-Analyse des hochmolekularen Proteasomen-assoziierten Proteins nach Alkylierung mit Iodacetamid und tryptischem Verdau.^a ein Serin phosphoryliert.

Protein (ORF)	Position	Masse [M+H] ⁺ erhalten [Da]	Masse [M+H] ⁺ geschätzt [Da]	Sequenz
YFL007w	1-18	1856.02	1855.940	TANNDDDIKSPIPITNK
YFL007w	29-41	1409.72	1409.642	SPGRPSSSQGEIK ^a
YFL007w	47-59	1532.77	1532.736	LYAADGRPHSPLR ^a
YFL007w	72-85	1596.72	1596.769	LFNGMDSTSLNER
YFL007w	86-97	1509.70	1509.733	LQHYTLDYVSDR
YFL007w	290-306	2007.13	2007.039	LVSLDDDRTNFTELLQK
YFL007w	950-958	1075.54	1075.532	WGGLQFDPR
YFL007w	1074-1085	1385.58	1385.607	SGKDDDYIESK
YFL007w	1593-1600	973.42	973.520	ENELEVLK
YFL007w	1613-1625	1534.72	1534.717	DVTMNLVQDNETR
YFL007w	1784-1798	1892.92	1892.918	LFDELVFDHPYDQVR
YFL006w	196-205	1161.66	1161.602	QLSNLSSWAR

Durch die massenspektroskopische Analyse konnte das hochmolekulare Proteasomen-assoziierte Protein als Blm3 identifiziert werden, laut Genomdatenbank (*Saccharomyces* Genome Database, <http://www.yeastgenome.org>) codiert durch den Offenen Leserahmen (ORF, Open ReadinG Frame) *YFL007W* auf Chromosom VI. Durch DNA-Sequenzierung des C-Terminus von *BLM3* mit den Oligonucleotiden 21 und 22 als Primern wurde ein Sequenzfehler in der Genomdatenbank gefunden, dessen Korrektur zu einer Veränderung des Leserahmens führt. Der für Blm3 codierende ORF umfasst nach der Korrektur die ORFs *YFL007W* und *YFL006W*, wobei die Proteinsequenz des ORFs *YFL006W* unverändert bleibt (Abb. 12). Dieses Ergebnis stimmt mit der massenspektroskopischen Analyse überein, in der ein Peptid identifiziert wurde, das durch den ORF *YFL006W* codiert wird (Tabelle 2). Inzwischen ist der Sequenzfehler in der Genomdatenbank korrigiert worden.

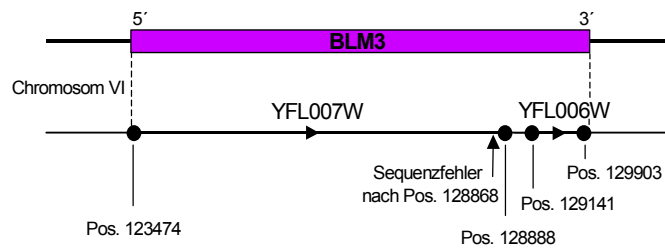


Abb. 12: Der Genlokus von *BLM3* umfasst die ORFs *YFL007W* und *YFL006W*

In der *BLM3*-Sequenz der Datenbank *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>) fehlt nach der Position 128868 ein Guanin (statt cca-gct lautet die richtige Sequenz ccaggct). Die Korrektur dieses Sequenzfehlers, der strangabwärts des ORFs *YFL007W* lokalisiert ist, hat eine Veränderung des Leserahmens zur Folge, so dass sich die tatsächlich für *BLM3* codierende Sequenz über die ORFs *YFL007W* und *YFL006W* erstreckt.

5.3 Blm3

5.3.1 Datenbankinformationen zu Blm3

Das Protein Blm3 besteht aus 2143 Aminosäuren und hat eine theoretische molare Masse von 246kDa (Abb. 13). Der isoelektrische Punkt von Blm3 liegt bei 5,6. Aufgrund zwölf potentieller Transmembrandomänen wird Blm3 in der *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>) als potentielles integrales Membranprotein bezeichnet. Da Blm3 Bestandteil von Proteasomenpräparationen ist, die aus Zellaufschlüssen ohne Detergens isoliert wurden (Abb. 11), kann allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich bei Blm3 um ein integrales Membranprotein handelt. Im N-terminalen Bereich weist Blm3 eine potentielle zweiteilige Kernlokalisierungs-Sequenz (NLS, Nuclear Localisation Signal) auf, bestehend aus zwei Clustern der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, die durch 15 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Damit gehört diese Sequenz zu den „klassischen“ NLS (cNLS), die als Signalsequenzen für das Karyopherin α / Karyopherin β -Heterodimer dienen (Weis, 2003).

In einer massenspektroskopischen Phosphoproteom-Analyse wurden Phosphorylierungen eines Serins und eines Threonins im N-terminalen Bereich von Blm3 gefunden (Ficarro *et al.*, 2002).

MTANND~~DD~~DIK SPIPITN~~KT~~L SQL~~K~~R~~F~~ERSP GRPSSSQGEI ~~K~~R~~K~~~~K~~S~~R~~LYAA DGRPHSPLRA
 R~~A~~S~~T~~P~~T~~LQDQ KLFNGMDSTS LLNERLQHYT LDYVSDRAQH MKN~~I~~YDPSSR WFSRSVRPEF
 P~~I~~E~~E~~F~~L~~PYKT ESHEDQAKYL ~~C~~H~~V~~L~~V~~NLYIA ~~I~~S~~S~~L~~D~~IQGLI SISSKDLADL KKEVDDLALK
 TDLFRLSNNT AENDLLGNDI ADYDDAEGLE DELDEYFDLA GPDFNATGKI TAKSATIVNV
 NHWTNELKNC LHFDFPVALR KSLATVYYL SLVQGQKVYR QMHVDMFERL VSLDDDRTNF
 TELLQKQGLL LDHQIMLNFL CEFLPYDPDP YARYELSSKE DLQLFRLLK HAHNAKPFDD
 KSKESLLVDT MNFLLSSLAP ~~S~~T~~M~~MAVMPIV ~~T~~S~~V~~V~~P~~YHYHI HSKI~~I~~DYFPF ~~C~~YSIWSSVSA
 NVAIDTHMYD FVGSISKDVH NKILSSEHEK ~~D~~V~~V~~G~~V~~E~~F~~GEEF ~~G~~I~~F~~T~~D~~DQMTF ~~M~~F~~N~~RLQGHLR
 TDGQIHSYSR TVKPFVYAIN GSKKDRFFEK LVSLAKAIET FIHPSNNGFW TKPNAKFVHA
 FIKSYHGRVK YEEDICARGV TNG~~I~~C~~L~~T~~S~~F~~C~~ ~~H~~E~~E~~I~~V~~E~~I~~F~~L~~N ~~I~~I~~S~~L~~G~~SQKNK PDIANYYISC
 FAYLLELDPS NAYLIYDKIL IDLYDTLADQ FINSRHRIS SLKQFTRVIR FIVMDKLYRV
 HITNVLMLV SKLDMNDTNL TSN~~L~~I~~N~~G~~I~~V~~S~~ ~~I~~A~~A~~F~~I~~P~~I~~QDL TGEDDYISFE SDTLPVQQH
 FYHIKCGESS KTRFVDELL NNAFKASTTV FQSMKVYVE KIFQLVDVDL EDSLVTKINQ
 TTMILQESMD DKIFNYFASL LQRNFWSNS FKEKDPNYEL VTIPLAALVR RNNGLSKELV
 RTLLFHIKEQ IKRGAGSVRS TSEIQQRDVK LVLYLTALND VLRQCHESLL EYSDELITFM
 KYLYDNVTNP ~~P~~L~~D~~V~~I~~T~~S~~I~~V~~I ~~H~~S~~A~~L~~A~~T~~L~~C~~T~~T EITDCRLFPE DSKIPEKDRW GGLQFDPRRF
 DKQHSFQWH VPSSDEITLS ISILESSEY CINNVEELMK APRHDSEYGD MIQYVLVMT
 HTLSGSSLLF DPDFNKYRTQ SNLSYREKLI LLKNIRENNC DPQELDIDIE QIRSGKDD
YIESKDIEAG LNAGVSDVVQ LRDEFDEL VDEEVVSEMP SGVNTPIAGT HGTDNSAMSS
 DLAFRDLDIY TCNYFNGTT EEKLQNPQYL QVHRVRARIG HFFHKLYVFL STNFENNTNM
 FQILLHGLKV WFTDLGQETV FNEDPNAFID VDFLENVQSL SHVNEPFTRT NFAIRANSLH
 QSRVLLHSTN RKASKLENLL LVDIIQLATS LYPDIYKPAQ GTLVHCKMQL VGSYGVVINK
 IIPSLEKAIK DHYMKIQVI LNVLLIKKIH RKLMTDYKDI GRILIFLLIEC CRVNELEIGM
 YADK~~I~~L~~T~~D~~I~~V ~~I~~G~~I~~K~~I~~P~~S~~S~~V~~C ~~V~~I~~S~~D~~Q~~A~~F~~L~~P~~L APPDGTINLQ VEAVKLAKKK KREYLSLLV
 DLQDKLLDKL DNEKDMGWI RMFILRFVTQ IQSNLESKPD KRAVFSIISQ ISTKHPEIIH
 LVVKSLLSTC NKIISLSDYE YDITRAYKNE FNPSFVEILD TSTTSFPKTF TEEMNFDNP
 KYFIDLRAYV GWLCWGRMY VMSPKALKLN LRENELEVLK TAGHLLTREF LRDVTMNLVQ
DNETRG~~V~~FSS ~~G~~N~~V~~S~~F~~F~~S~~L~~V~~I ~~L~~L~~I~~SSGFCEL NMSDLFELCE SYYNKDDKAS ~~M~~I~~M~~S~~V~~E~~I~~VAG
~~L~~V~~C~~G~~S~~KFMSV SLDKRDTFI ENFLAKCLDY ELNHDAFEIW STLAWWLPV VDLRRSKTFF
 CHFINADGMF DRESDAATHQ TSKIYMLRSI LMSMEFRAPD VGKLFDELVF DHPYDQVRQA
 VAKLLTTLVQ NQSNPSISDP TTLLEAERN PDGLGLPLKS VPEKVDAYIK KQFEIKNLE
 DSVVGLNPQQ FIKTDYFYRT STIFYWIKEM ARGPNK~~V~~LLV ~~P~~Y~~L~~V~~D~~Y~~V~~L~~P~~F ~~L~~I~~G~~L~~V~~KHKDV
 CALASLDPVR LYAGLGYMPI RKNHVAIVD YVCSSNVALS SNQTKLQAF IQHFLSAELL
 QLTEEEKNKI LEFVVSNLN EQFVEVRVRA ASILSDIVHN WKEEQPLLSL IERFAKGLDV
 NKYTSKERQK LSKTDIKIHG ~~N~~V~~L~~G~~L~~G~~A~~I~~I~~S ~~A~~F~~P~~Y~~V~~F~~P~~L~~P~~P WIPKQLSNLS SWARTSGMTG
 QAAKNTISEF KKVRADTWKF DRASFNTEEL EDLEGVLWRS YYA

Abb. 13: Proteinsequenz von Blm3

X Potentielle Kernlokalisierungs-Sequenz (NLS, Nuclear Localisation Signal), **X** potentielle Transmembrandomäne, **X** Phosphorylierungsstelle (Ficarro *et al.*, 2002), **X** Peptidsequenz, gegen die der Blm3-Antikörper gerichtet ist, **X** massenspektroskopisch identifizierte Peptide

Ein Hinweis auf die Funktion von Blm3 lässt sich aus der Proteinsequenz nicht ableiten. Im Proteom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* findet sich mit Ymr247c ein Protein ebenfalls unbekannter Funktion, das zu Blm3 eine Identität von 20% und eine

Homologie von 42% aufweist. Auch in höheren Eukaryonten und *A. thaliana* existieren zu Blm3 homologe Proteine, die Identitäten von etwa 20% aufweisen. PA200 (Proteasomal Activator, 200kDa), mit 17% Identität das humane Homologe zu Blm3, wurde als Proteasomen-Aktivator beschrieben (Ustrell *et al.*, 2002).

5.3.2 Proteomik

Durch Affinitätschromatographie (tandem-affinity purification, TAP) Protein A-markierter Proteine mit anschließender Elution der säulengebundenen Proteinkomplexe durch Spaltung an einer TEV-Schnittstelle, nachfolgender SDS-PAGE und anschließender massenspektrometrischer Analyse der erhaltenen Proteinbanden wurden Proteinkomplexe aus *S. cerevisiae* charakterisiert (Gavin *et al.*, 2002). In einem ähnlichen Ansatz wurden Proteinkomplexe aus *S. cerevisiae* über Flag-markierte Proteine durch Affinitätschromatographie mit anschließender SDS-PAGE und massenspektrometrischer Analyse der Proteinbanden identifiziert (Ho *et al.*, 2002). Die erhaltenen Datensätze sind über die Biomolecular Interaction Network Database zugänglich (BIND, <http://www.bind.ca>; Bader *et al.*, 2003). Blm3 wurde nicht nur als Bestandteil von Komplexen gefunden, die über die proteasomalen Untereinheiten Pre8/ α 2 und Scl1/ α 1 isoliert wurden, sondern auch als Komponente von Komplexen, die über das Flag-markierte Protein Sir4 sowie über das TAP-markierte Protein Zds2 gereinigt wurden (Tabelle 3). Sir4 (Silent Information Regulator) ist ein nukleäres Protein, das in einem Komplex mit Sir2 und Sir3 vorliegt und an der Bildung repressiver Chromatin-Strukturen beteiligt ist (Gasser und Cockell, 2001; Critchlow und Jackson, 1998). Diese repressiven Strukturen sind für die transkriptionelle Repression, für die Stabilität der Chromosomen und für die Unterstützung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch den NHEJ-Mechanismus erforderlich (Gartenberg, 2000; Haber, 1999; Lewis und Resnick, 2000). Sir4 scheint durch das 26S-Proteasom degradiert zu werden (Kahana und Gottschling, 1999). Als weiterer Bestandteil dieses Sir4-assoziierten Komplexes wurde das Importin α -Homologe Srp1 gefunden, ein Protein, das am Import von Proteinen in den Zellkern beteiligt ist (Ho *et al.*, 2002; Enenkel *et al.*, 1995). Der Komplex um das Protein Zds2 wird der Signalübertragung zugeordnet, wobei die molekulare Funktion von Zds2 unbekannt ist (Gavin *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2003). In diesem Komplex wurde als einzige proteasomale Untereinheit Pre10/ α 7 identifiziert. Die beiden Komplexe, die mithilfe der markierten proteasomalen

Untereinheiten Pre8/ α 2 und Scl1/ α 1 isoliert wurden, enthalten im Wesentlichen weitere Untereinheiten des Proteasoms.

Tabelle 3: Affinitätschromatographisch isolierte Proteinkomplexe aus *S. cerevisiae*, in denen das Protein Blm3 detektiert wurde (Bader *et al.*, 2003; ¹Ho *et al.*, 2002; ²Gavin *et al.*, 2002)

Markiertes Protein	kopräzipitierte Proteine
Sir4 (Flag-Tag) ¹	Srp1, Sir3, Sir2, Sec53, Blm3
Sir4 (Flag-Tag) ¹	Srp1, Sir3, Sir2, Blm3
Pre8/ α 2 (TAP-Tag) ²	Scl1/ α 1, Ecm29, Blm3, Pre4/ β 7, Est3, Pre6/ α 4, Pup3/ β 3, Pre5/ α 6, Pre9/ α 3
Scl1/ α 1 (TAP-Tag) ²	Rgr1, Pre3/ β 1, Yfl006w, Pre4/ β 7, Pre10/ α 7, Blm3, Pre2/ β 5, Pre5/ α 3, Pre6/ α 4, Pup3/ β 3, Pre9/ α 3, Pre8/ α 2
Zds2 (TAP-Tag) ²	Blm3, Pph22, Cdc55, Tpd3, Pre10/ α 7

In einem früheren Ansatz zur Identifizierung Nucleotid-sensitiver Proteasomen-interagierender Proteine durch massenspektroskopische Analyse affinitätsgereinigter Proteasomen wurde das mit 43% Homologie zu Blm3 potenziell homologe Protein Ymr247c als an den 19S-Regulator assoziiertes Protein beobachtet, Blm3 dagegen wurde nicht gefunden (Verma *et al.*, 2000).

Die Transkription vieler Gene, die mit der proteasomalen Degradation in Verbindung stehen, ist in *S. cerevisiae* mit einem Teil der für die DNA-Reparatur-Mechanismen Base Excision Repair (BER) und Nucleotide Excision Repair (NER) benötigten Gene koreguliert. Hierbei moduliert das Proteasomen-assoziierte Protein Rpn4 ein gemeinsames transkriptionelles Regulon. Für das Gen *BLM3* konnte keine Koregulation mit proteasomalen Genen bzw. DNA-Reparatur-Genen beobachtet werden (Jelinsky *et al.*, 2000).

5.3.3 Blm3 und PA200

C. W. Moore beschrieb 1991 die Punktmutante *blm3-1*, die sich hypersensitiv gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin verhält (Moore, 1991). Bleomycine bilden eine Familie hydrophiler Antitumor-Antibiotika (Ishizuka *et al.*, 1967) und werden aus dem Bakterium *Streptomyces verticillus* isoliert. Bleomycin verursacht in Anwesenheit von Sauerstoff und zweiwertigen Eisenionen unter Bildung freier Radikale Doppelstrangbrüche der DNA (Petering *et al.*, 1990; Steighner und Povirk, 1990). In *S. cerevisiae* wurden unter Einwirkung von Bleomycin zudem Läsionen in der Plasmamembran beobachtet (Beaudouin *et al.*, 1993; Moore, 1999). Phleomycine wie z.

B. Zeocin sind den Bleomycinen strukturverwandt (Umezawa, 1979). Neben der Bleomycin-Hypersensitivität zeigt die *blm3-1*-Mutante Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und eine geringfügig erhöhte Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid (Moore, 1991). Auch der Deletionsstamm $\Delta blm3$ wurde als hypersensitiv gegenüber Bleomycin beschrieben (Evans Febres *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Blm3 entweder am Transport von Bleomycin über die Plasmamembran in das Zellinnere oder an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sein könnte.

Das humane Homologe zu Blm3, PA200 (Proteasomal Activator, 200kDa), wurde als Proteasomen-Aktivator beschrieben, da es *in vitro* eine Aktivierung des Proteasoms hinsichtlich der Degradation fluorogener Peptidsubstrate zeigt (Ustrell *et al.*, 2002). Wie einige DNA-Reparatur-Faktoren bildet PA200 nach γ -Bestrahlung intranukleäre punktförmige Ansammlungen, weshalb eine Beteiligung von PA200 an der DNA-Reparatur vermutet wird (Ustrell *et al.*, 2002).

5.4 Deletionsmutante $\Delta blm3::HIS3$

Mithilfe der Oligonucleotide 7 und 8 sowie des Plasmids pJJ215 wurde durch PCR ein Deletionskonstrukt hergestellt, in dem das *HIS3*-Gen durch –53 Basenpaare strangaufwärts und +61 Basenpaare strangabwärts des ORFs *YFL007W* flankiert wurde. Dieses Deletionskonstrukt wurde durch homologe Rekombination in das Wildtyp-Genom integriert. Die Deletion wurde durch PCR und durch Southern Blot-Analyse überprüft (Abb. 14).

5.5 Untersuchung von $\Delta blm3$ -Zellen auf Phänotypen

Die Deletionsmutante $\Delta blm3$ ist lebensfähig, das Protein Blm3 also nicht essentiell. Der $\Delta blm3$ -Deletionsstamm verhält sich morphologisch unauffällig und zeigt keinen Sporulationsdefekt.

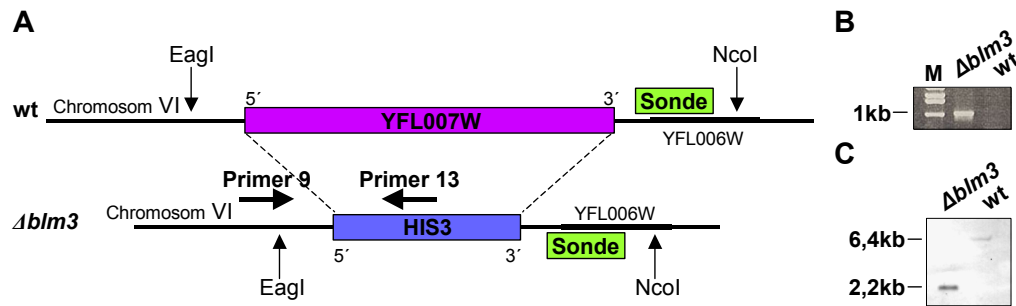


Abb. 14: Deletion des ORFs *YFL007W* durch homologe Rekombination des *HIS3*-Gens in den ORF *YFL007W*

A Durch Restriktion der genomischen DNA mit EagI und NcoI entsteht aus der Wildtyp-DNA ein DNA-Fragment von 6,4kb Größe, aus der Deletionsmutanten-DNA ein DNA-Fragment von 2,2kb Größe. **B** Detektion der erfolgten Deletion durch PCR mithilfe der Primer 9 und 13. Das PCR-Produkt ist 1059bp groß (vgl. A). **C** Detektion der erfolgten Deletion durch Southern Blot-Analyse mithilfe der Sonde 14/15, die strangabwärts des ORFs *YFL007W* hybridisiert (vgl. A).

5.5.1 Untersuchung der Sensitivität gegenüber Bleomycin und Zeocin

Für die Punktmutante *blm3-1* und die *Δblm3*-Deletionsmutante wurde eine Hypersensitivität gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin und dem strukturverwandten Zeocin beschrieben (Moore, 1991; Evans Febres *et al.*, 2001). Bleomycine stellen eine Familie hydrophiler Antitumor-Antibiotika dar (Ishizuka *et al.*, 1967), die in Gegenwart von Sauerstoff und zweiwertigen Eisenionen DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen (Petering *et al.*, 1990; Steighner und Povirk, 1990). Bleomycin verursacht zudem Läsionen in der Plasmamembran von *S. cerevisiae* (Beaudouin *et al.*, 1993; Moore, 1999). Aufgrund der für die Punktmutante *blm3-1* und die *Δblm3*-Deletionsmutante beobachteten Bleomycin-Hypersensitivität wird eine Beteiligung des Proteins Blm3 am Mechanismus der DNA-Reparatur vermutet (Moore, 1991; Evans Febres *et al.*, 2001). PA200, das humane Homologe zu Blm3, ist nukleär und zeigt nach Einwirkung von γ -Strahlung auf die Zelle diskrete punktförmige Ansammlungen im Zellkern (Ustrell *et al.*, 2002). Eine derartige intranukleäre Verteilung nach DNA-Schädigung wurde auch für an der DNA-Reparatur beteiligte Faktoren wie Rad52 beschrieben (Lisby *et al.*, 2001). Daher wird vermutet, dass PA200 am DNA-Reparatur-Mechanismus beteiligt ist (Ustrell *et al.*, 2002). Zur Verifizierung der Ergebnisse von Moore *et al.* und Evans Febres *et al.* wurden Verdünnungsreihen stationärer Kulturen vom Wildtyp und der *Δblm3*-Deletionsmutante auf YPD-Platten,

die mit Bleomycin oder Zeocin in verschiedenen Konzentrationen versetzt wurden, aufgetropft (Abb. 15). Neben dem Wildtyp-Stamm wurden zur Kontrolle auch die proteasomalen Mutantenstämme *pre1-1 pre2-2*, *cim5-1* und *cim3-1* aufgetragen. Entgegen den veröffentlichten Ergebnissen von Moore *et al.* und Evans Febres *et al.* konnte keine Hypersensitivität der *Abm3*-Deletionsmutante gegenüber diesen radiomimetischen Agenzien festgestellt werden. Daher kann aus den hier erhaltenen Ergebnissen nicht auf eine direkte Beteiligung des Proteins Blm3 am Mechanismus der DNA-Reparatur geschlossen werden. Die proteasomalen Mutanten *pre1-1 pre2-2* und *cim5-1* zeigen dagegen eine deutliche Hypersensitivität gegenüber Bleomycin und Zeocin (Abb. 15). Pre2/β5 ist eine der katalytischen, Pre1/β4 eine der nicht-katalytischen β-Untereinheiten des Proteasoms; beide sind im β-Ring benachbart und essentiell (Heinemeyer, 2000). Die *pre1-1*-Mutation verhindert den Kontakt der aktiven Untereinheit Pre2/β5 mit den benachbarten Ringen und erschwert dadurch die autokatalytische Prozessierung von Pre2/β5 sowie die richtige Orientierung der benachbarten Untereinheiten (Heinemeyer, 2000). Die Doppelmutante *pre1-1 pre2-2* zeigt verminderte chymotryptische Aktivität, Akkumulation hochmolekularer Konjugate und Wachstumsdefekte (Heinemeyer, 2000). Die Punktmutation *cim5-1* betrifft Rpt1, eine der ATPase-Untereinheiten des regulatorischen 19S-Komplexes. Die Bleomycin-Hypersensitivität dieser verschiedenen proteasomalen Mutanten deutet auf eine generelle Beteiligung des proteasomalen Systems am DNA-Reparatur-Mechanismus hin.

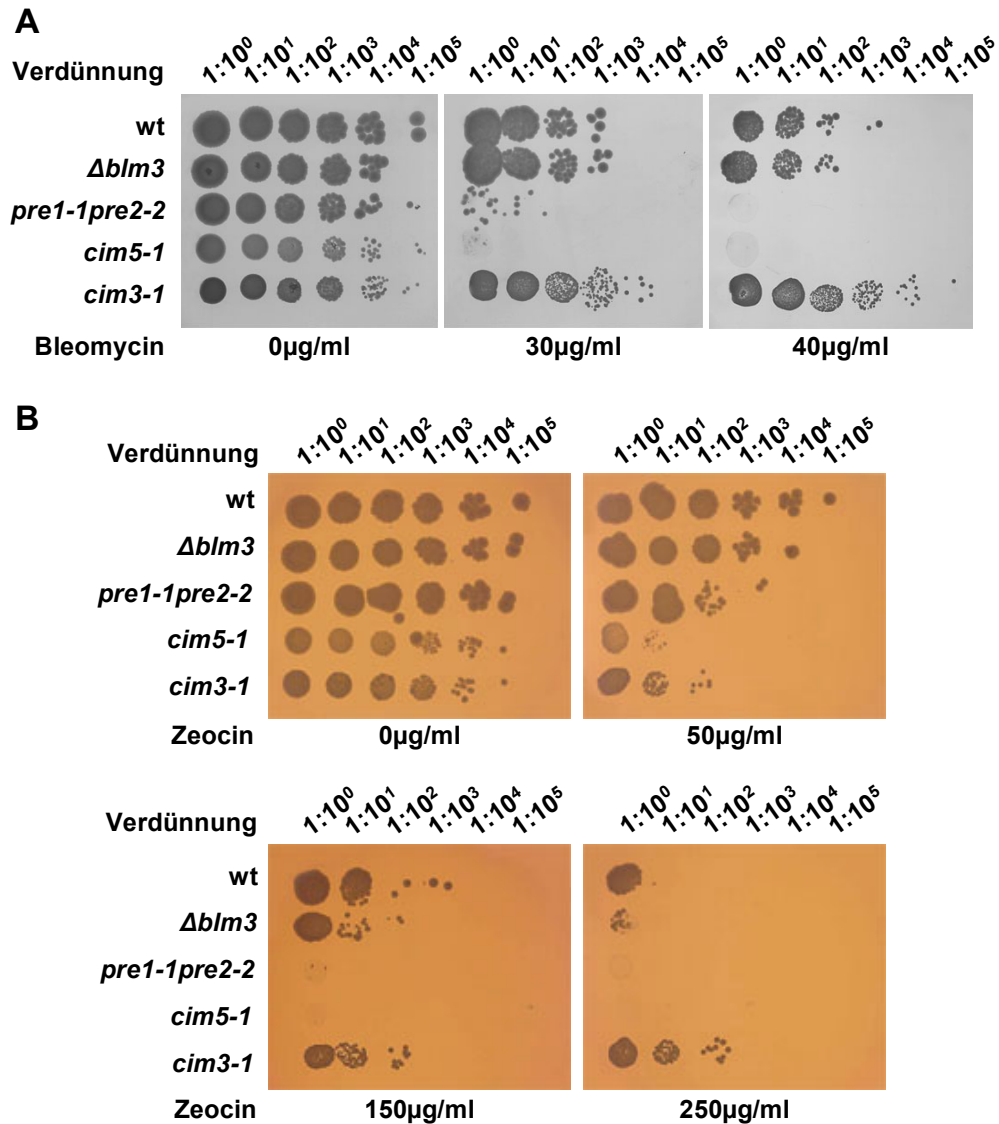


Abb. 15: *Δblm3*-Zellen zeigen weder Bleomycin- noch Zeocinsensitivität

Stationäre Kulturen von Wildtyp, *Δblm3*, *pre1-1pre2-2*, *cim5-1* und *cim3-1* wurden mehrfach 1:10 verdünnt, und jeweils 4μl der Verdünnungen wurden auf YPD-Platten aufgetropft, die unterschiedliche Konzentrationen an Bleomycin (**A**) bzw. Zeocin (**B**) enthielten. Pre1 ist β4, Pre2 β5, Cim5 ist Rpt1 und Cim3 ist Rpt6 (zur Nomenklatur proteasomaler Untereinheiten vgl. Anhang 1).

5.5.2 Temperatursensitivität von *Δblm3*-Zellen

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der *Δblm3*-Deletionsmutante wurde ihr Wachstum bei 28°C und 37°C untersucht. Durch das Auftropfen von 1:10-Verdünnungen auf YPD-Platten und das Aufnehmen von Wachstumskurven konnte gezeigt werden, dass der *Δblm3*-Deletionsstamm bei 28°C vergleichbar wie der Wildtyp wächst, bei 37°C jedoch eine Temperatursensitivität aufweist (Abb. 16).

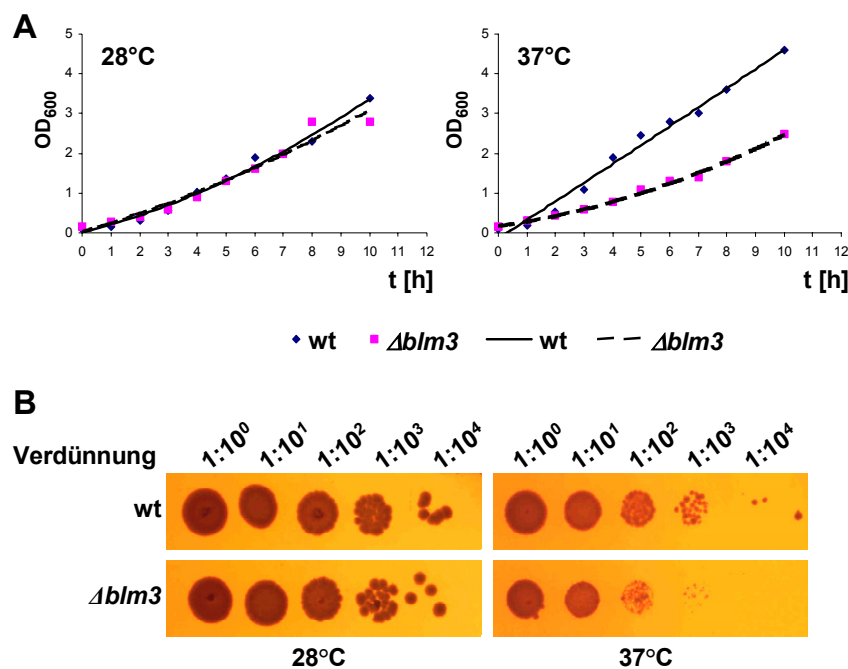


Abb. 16: *Δblm3*-Zellen sind leicht temperatursensitiv

A Wachstumskurven von Wildtyp und *Δblm3*-Deletionsmutante in YPD bei 28°C bzw. 37°C, aufgenommen durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) über einen Zeitraum von 10h. Eine OD von 1,0 entspricht einer Zelldichte von etwa 3×10^7 Zellen/ml. **B** Stationäre Kulturen gleicher Zelldichte wurden jeweils 1:10 verdünnt, auf YPD-Platten aufgetropft und bei 28°C bzw. 37°C inkubiert.

5.5.3 Untersuchung der Canavanin-Sensitivität von *Δblm3*-Zellen

Canavanin führt als Arginin-Analogon zur vermehrten Produktion fehlgefalteter Proteine. Einige proteasomale Mutanten, die Defekte in der proteasomalen Degradation zeigen, sind daher Canavanin-sensitiv. Ein Beispiel hierfür sind die Mutanten *pre1-1* und *pre2-2* (Pre1=β4, Pre2=β5), die einen Defekt in der Chymotrypsin-artigen Aktivität

des Proteasoms zeigen (Heinemeyer *et al.*, 1991; Heinemeyer *et al.*, 1993). Eine Punktmutation in der katalytischen Untereinheit Pre4/ β 7 führt dagegen trotz des kompletten Ausfalls der PGPH-Aktivität nicht zur Canavanin-Hypersensitivität der Zellen (Hilt *et al.*, 1993). Die $\Delta blm3$ -Deletionsmutante zeigt keine Sensitivität gegenüber Canavanin (Abb. 17).

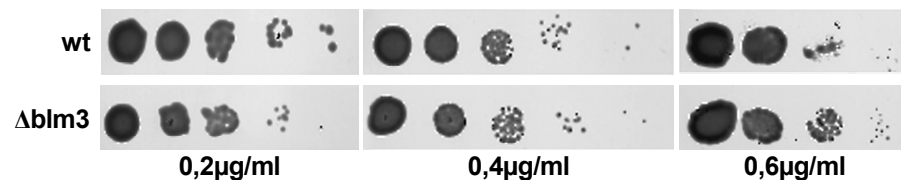


Abb. 17: $\Delta blm3$ -Zellen sind nicht Canavanin-sensitiv

Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen aus stationären Kulturen gleicher Zelldichte wurden mehrmals 1:10 verdünnt und jeweils auf CM arg⁻-Platten, die 0,2 μ g/ml, 0,4 μ g/ml bzw. 0,6 μ g/ml Canavanin enthielten, aufgetropft.

Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass in dieser Mutante die Degradation proteasomaler Substrate nicht beeinträchtigt ist. Aufgrund der in Kapitel 5.3.3 dargestellten publizierten Daten (Ustrell *et al.*, 2002) sind jedoch weitere Untersuchungen der proteasomalen Aktivität in $\Delta blm3$ -Zellen nötig.

5.5.4 $\Delta blm3$ -Zellen zeigen keine H₂O₂-Sensitivität

Das Ubiquitin/Proteasom-System spielt eine noch weitgehend ungeklärte Rolle in der Apoptose und scheint in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren entweder pro- oder anti-apoptotisch zu wirken (Wójcik, 1999). Die Apoptose kann unter anderem durch oxidative Bedingungen ausgelöst werden (Madeo *et al.*, 1999). Mit Stm1 wurde kürzlich in Hefe ein Zelltod-aktivierendes Protein gefunden, durch dessen Synthese oder proteasomale Degradation die H₂O₂-induzierte Apoptose reguliert wird (Ligr *et al.*, 2001). Die H₂O₂-Sensitivität von Hefezellen kann durch einen Halo-Assay getestet werden. Dazu wird ein H₂O₂-getränktes Filterpapier-Plättchen auf Platten aufgelegt, in die stationäre Hefekulturen eingegossen wurden. Der im Laufe des Wachstums entstehende Hof um die H₂O₂-Quelle lässt auf die H₂O₂-Empfindlichkeit der Hefezellen schließen. Das Einwachsen von Hefezellen in den zunächst um die H₂O₂-Quelle ausgebildeten Hof ist dabei ein Maß für die Empfindlichkeit der Hefezellen gegenüber H₂O₂ (Ligr *et al.*, 2001). Der Halo-Assay zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen

Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen (Abb. 18). Es liegt daher kein Anhaltspunkt für eine Beteiligung des Proteins Blm3 am Mechanismus der Apoptose vor.

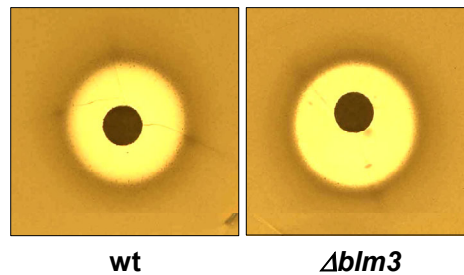


Abb. 18: *Δblm3*-Zellen zeigen keine H₂O₂-Überempfindlichkeit

Stationäre Kulturen aus in YPD angewachsenen Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen wurden mit 0,5% Agar in YPD (40°C) gemischt und auf YPD-Platten gegossen. Whatman 003-Papierscheibchen wurden mit 10μl 30% H₂O₂ getränkt und auf die Oberfläche dieser Platten aufgebracht. Die Formation der Halonen wurde nach 2d Wachstum bei 28°C aufgenommen.

5.6 *In situ* und *in vitro*-Aktivitätstests

PA200, das humane Homologe zu Blm3, wurde als Proteasomen-Aktivator beschrieben, der vermutlich analog zu PA28 anstelle der 19S-Regulatoren an den 20S-Komplex bindet (Ustrell *et al.*, 2002). In *in vitro*-Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten ließ sich die Aktivität konventionell gereinigter Proteasomen durch Zugabe von isoliertem PA200 auf den zwei- bis zehnfachen Wert steigern. Dagegen wurde der Abbau radioaktiv markierter Proteinsubstrate *in vitro* durch die Zugabe von PA200 nur geringfügig beeinflusst: Während die proteasomale Degradation von Casein *in vitro* durch PA200 um 20% inhibiert wurde, steigerte PA200 die Degradation von ubiquitiniertem Lysozym um 20% (Ustrell *et al.*, 2002).

Zur Klärung der Frage, ob Blm3 ähnlich wie PA200 einen Proteasomen-aktivierenden Effekt aufweist, wurden zunächst *in situ*- und *in vitro*-Aktivitätstests durchgeführt.

5.6.1 *In situ*-Aktivität des *Δblm3*-Stamms

Zunächst wurde die proteolytische Aktivität des *Δblm3*-Deletionsstamms mithilfe eines *in situ*-Tests untersucht. Dazu wurden in einem Überschichtungstest (Enenkel und Wolf, 1993; Wolf und Fink, 1975) die Membranen von auf einem Filterpapier gewachsenen Hefekolonien mit Chloroform permeabilisiert. Anschließend wurden die

Kolonien mit dem proteasomalen Peptidsubstrat Z-LLE- β NA (Glu- β NA) überschichtet. Durch eine nachfolgende Farbreaktion wurde die Proteolyse des Substrats sichtbar gemacht werden. Dieser *in situ*-Test zeigte keine veränderte proteolytische Aktivität der $\Delta blm3$ -Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 19).

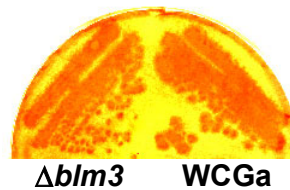


Abb. 19: Die proteolytische *in situ*- Aktivität von $\Delta blm3$ -Zellen entspricht der von Wildtyp-Zellen

In einem Überschichtungstest zur *in situ*-Bestimmung von proteolytischer Aktivität wurden die Membranen von auf Filterpapier gewachsenen Hefekolonien permeabilisiert und anschließend mit dem Peptidsubstrat Z-LLE- β NA überschichtet. Durch eine nachfolgende Farbreaktion wurde die Proteolyse des Substrats sichtbar gemacht.

Bei der Interpretation dieses Ergebnisses ist zu berücksichtigen, dass durch diesen *in situ*-Test die gesamten proteolytischen Aktivitäten der Zelle erfasst werden. Da Blm3 substöchiometrisch an das Proteasom assoziiert vorzuliegen scheint (Abb. 11), aktiviert bzw. inhibiert es möglicherweise nur eine proteasomale Subpopulation, oder es aktiviert bzw. inhibiert nur die Degradation bestimmter Substratproteine. Unter diesen Bedingungen sind Aktivitätsunterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta blm3$ -Deletionsstamm durch *in vitro*- oder *in situ*-Tests mit fluorogenen Peptidsubstraten nur schwer oder gar nicht detektierbar.

5.6.2 *In vitro*-Aktivität des Proteasoms aus dem $\Delta blm3$ -Stamm

Um die *in vitro*-Aktivität von gereinigten Proteasomen aus dem $\Delta blm3$ -Deletionsstamm mit der von aus dem Wildtyp präparierten Proteasomen vergleichen zu können, wurde ein Stamm hergestellt, der neben der $\Delta blm3$ -Deletion die Streptavidin (Strep)-markierte proteasomale Untereinheit Pre6/ α 4 enthält. Durch Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose lassen sich daraus native Proteasomen isolieren und hinsichtlich ihrer Aktivität mit Proteasomen aus dem entsprechenden Wildtypstamm vergleichen. Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten ergeben auch für die

gereinigten Proteasomen keinen Unterschied zwischen den Präparationen aus Wildtyp- und Mutantenstamm. Da Blm3 in Proteasomen-Präparationen substöchiometrisch vorliegt (Abb. 11) und auch das humane PA200 nur einen schwachen aktivierenden Effekt auf das Proteasom zeigt (Ustrell *et al.*, 2002), erscheint es verständlich, dass sich ein eventueller aktivierender Effekt von Blm3 auf eine proteasomale Subpopulation in Gesamtlysaten und in Proteasomenpräparationen nicht nachweisen lässt. Aktivitätstests, in denen isoliertes Blm3 zu affinitätschromatographisch präparierten 20S-Proteasomen zugegeben wurde, sollten Ergebnisse liefern, die mit denen von Ustrell *et al.* vergleichbar sind.

5.6.3 Einfluss von gereinigtem Blm3 auf die proteasomale Aktivität

Ustrell *et al.* fanden in Aktivitätstests mit dem humanen Homologen PA200 eine Aktivierung des Proteasoms auf das 2-10fache des Ausgangswertes, wobei sie PA200 zu 20S in einem molaren Verhältnis von 5:1 einsetzten (Ustrell *et al.*, 2002). Um zu überprüfen, ob Blm3 – wie für sein humanes Homolog PA200 beschrieben (Ustrell *et al.*, 2002) – Proteasomen aktiviert, wurde isoliertes Blm3 in Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten zu affinitätschromatisch präparierten 20S-Proteasomen gegeben. Dazu wurden nach einem Zellaufschluss, der unter Apyrasezusatz erfolgte, zunächst 20S-Proteasomen über die Protein A-markierte α -Untereinheit Pre6/ α 4 an IgG-Sepharose gebunden. Apyrase hydrolysiert ATP und führt damit zur Dissoziation des 26S-Proteasoms in 20S- und 19S-Komplex. Das an die gebundenen Proteasomen assoziierte Blm3 wurde durch 1M NaCl eluiert. Um native 20S-Proteasomen ohne assoziiertes Blm3 isolieren zu können, wurde im $\Delta blm3$ -Deletionsstamm die α -Untereinheit Pre6/ α 4 mit einer Streptavidin-Markierung versehen. Durch Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose ist es auf diese Weise möglich, native 20S-Proteasomen zu präparieren (Lehmann *et al.*, 2002).

Das isolierte Blm3 wurde in Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten zu nativen 20S-Proteasomen zugegeben. Die Aktivitätstests wurden mit den Substraten Bz-VGR-AMC (Arg-AMC), Z-GGL-AMC (Leu-AMC), Succ-LLVY-AMC (Tyr-AMC) und Z-LLE- β NA (Glu- β NA) durchgeführt. Während die Substrate Leu-AMC und Tyr-AMC durch die chymotryptische Aktivität des Proteasoms hydrolysiert werden, wird Arg-AMC durch die Trypsin-artige und Glu- β NA durch die PGPH-Aktivität des Proteasoms gespalten. Da das Proteasom auf die verschiedenen Substrate unterschiedlich sensitiv

reagiert, musste es in den Aktivitätstests in Abhängigkeit vom Substrat in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden. Die Aktivität, die ohne Zugabe von Blm3 gemessen wurde, wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

Für das Substrat Tyr-AMC konnte für alle getesteten molaren Verhältnisse von Blm3 zu 20S eine Inhibition der proteasomalen Aktivität beobachtet werden (Abb. 20A). Während bei Unterschuss von Blm3 zu 20S die proteasomale Aktivität auf eine Restaktivität von etwa 60% inhibiert wird, führt der Überschuss von Blm3 zu 20S zu einer starken Inhibition mit einer Restaktivität von 15-20%. Die Ergebnisse für das Substrat Glu-βNA zeigen, wenn auch weniger ausgeprägt, eine ähnliche Tendenz (Abb. 20B): Bei einem Unterschuss von Blm3 zu 20S ist mit einer proteasomalen Aktivität von 95-120% kein deutlicher Effekt zu beobachten. Bei einem äquimolaren Verhältnis oder beim Überschuss von Blm3 zu 20S kommt es dagegen zu einer Inhibition auf eine Restaktivität von etwa 45%. Für das Substrat Leu-AMC konnte mit proteasomalen Aktivitäten von 100-120% kein deutlicher Effekt beobachtet werden (Abb. 20C). Lediglich bei einem starken Überschuss von Blm3 zu 20S liegt eine Inhibition auf eine Restaktivität von etwa 70% vor. Für das Substrat Arg-AMC konnte für die beiden getesteten Verhältnisse von Blm3 zu 20S eine leichte Steigerung der proteasomalen Aktivität auf etwa 150% beobachtet werden (Abb. 20D).

Insgesamt lassen die durchgeführten Aktivitätstests folgende Schlüsse zu: Liegt Blm3 im Unterschuss zu 20S vor, dann wirkt es sich kaum (Abb. 20B, C und D) auf die proteasomale Aktivität aus. Lediglich mit dem Substrat Tyr-AMC konnte unter diesen Bedingungen eine Inhibition festgestellt werden (Abb. 20A). Liegt Blm3 im Überschuss vor, dann zeigt sich eine deutliche (Abb. 20B und C) bis starke Inhibition (Abb. 20A) der proteasomalen Aktivität.

Auf Grundlage der durchgeführten *in vitro*-Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten kann die Vermutung, bei Blm3 könnte es sich wie bei seinem humanen Homologen PA200 um einen Proteasomen-Aktivator handeln, nicht bestätigt werden. Insgesamt sprechen die erhaltenen Ergebnisse für eine schwache inhibitorische Wirkung des Proteins Blm3 auf das Proteasom. Ausgehend von der Tatsache, dass Blm3 an affinitätschromatographisch isolierten Proteasomen substöchiometrisch assoziiert gefunden wurde, erscheint es wahrscheinlich, dass Blm3 *in vivo* nur an eine definierte Subpopulation von Proteasomen assoziiert vorliegt, die wiederum durch Aktivitätstests nur schwer zu erfassen ist.

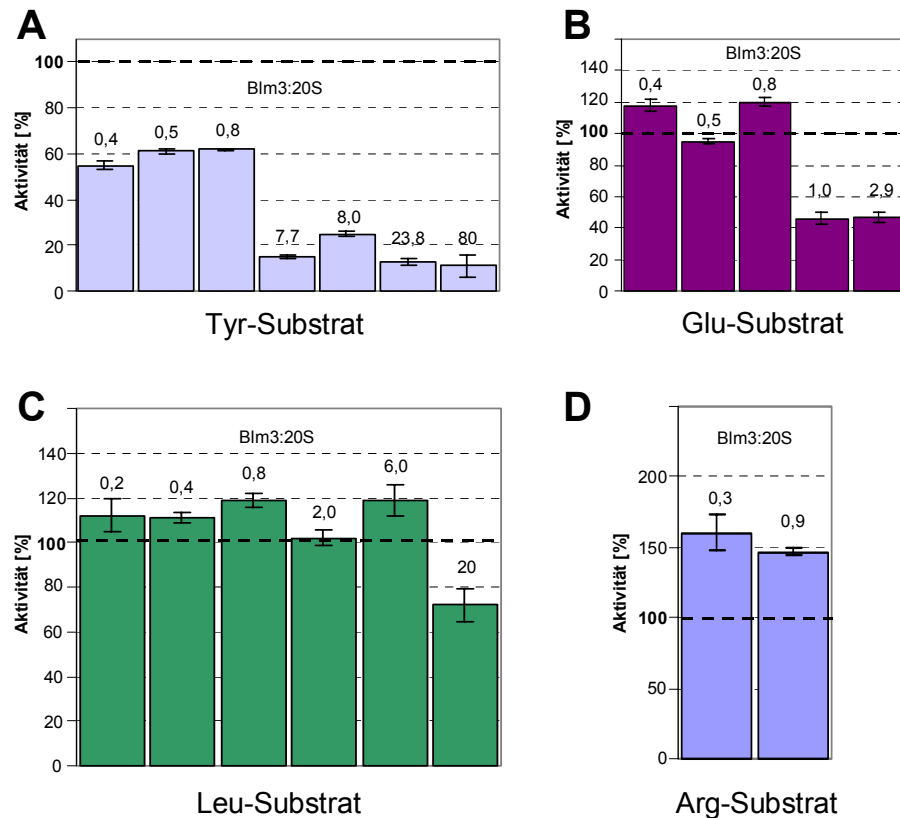


Abb. 20: Blm3 inhibiert die *in vitro*-Aktivität des 20S-Proteasoms geringfügig

Aktivität des 20S-Proteasoms in Gegenwart von Blm3, gemessen mit den fluorogenen Peptidsubstraten Arg-AMC, Leu-AMC, Tyr-AMC und Glu- β NA. Die Aktivität des 20S-Proteasoms ohne Zugabe von Blm3 beträgt 100%. Das molare Verhältnis von Blm3 zu 20S ist jeweils über den Säulen angegeben. In einem Aktivitätstest wurden zwischen 70fmol und 11pmol Proteasom eingesetzt, die Substratkonzentration betrug 100 μ mol/l. Die Messung erfolgte nach 30min Inkubation bei 37°C. **A** Aktivität des 20S-Proteasoms in Gegenwart von Blm3, gemessen mit dem Substrat Tyr-AMC. **B** Aktivität des 20S-Proteasoms in Gegenwart von Blm3, gemessen mit dem Substrat Glu- β NA. **C** Aktivität des 20S-Proteasoms in Gegenwart von Blm3, gemessen mit dem Substrat Leu-AMC. **D** Aktivität des 20S-Proteasoms in Gegenwart von Blm3, gemessen mit dem Substrat Arg-AMC.

5.7 *In vivo*-Aktivität des Proteasoms aus $\Delta blm3$ -Stämmen

Nachdem Blm3 in den *in vitro*-Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten einen schwachen inhibitorischen Einfluss auf die proteasomale Aktivität zeigte, wurden im Folgenden *in vivo*-Aktivitäten der $\Delta blm3$ -Deletionsmutante untersucht. Zunächst wurde die Degradation des cytosolischen proteasomalen Substratproteins FBPAse getestet. Da die Vermutung bestand, Blm3 könnte als Adapterprotein zwischen Proteasom und ER-

Membran bzw. Sec61-Kanal am ERAD-Mechanismus beteiligt sein, wurde zusätzlich die Degradation der ERAD-Substrate CPY* und CTG* untersucht.

5.7.1 Degradation von FBPase

Die proteasomale Degradation cytosolischer Proteine in der Deletionsmutante *Δblm3* wurde am Beispiel der Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) überprüft. Eine in Vollmedium gewachsene Kultur wurde dazu 16 Stunden in einem Medium inkubiert, das ausschließlich Ethanol als Kohlenstoffquelle enthielt. Dadurch wurde die Gluconeogenese induziert, was zur Expression der FBPase führte. Das anschließende Umsetzen der Kultur in dextroserhaltiges Vollmedium führte zum Abbau der FBPase, der durch Probenentnahme in Abständen von jeweils 30 Minuten, anschließende alkalische Lyse, SDS-PAGE, Western Blot und Anfärben der Membranen mit Antikörpern gegen FBPase nachgewiesen werden konnte (Abb. 21).

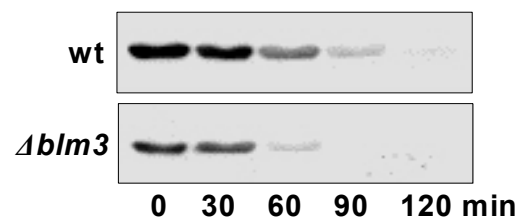


Abb. 21: Der FBPase-Abbau in *Δblm3*-Zellen ist gegenüber Wildtyp-Zellen leicht beschleunigt

Die proteasomale Degradation der cytosolischen FBPase in Wildtyp und *Δblm3*-Mutante. Die Synthese der FBPase wurde durch Medium induziert, das Ethanol als Kohlenstoffquelle enthielt. Nach Umsetzen der Zellen in glucosehaltiges Medium wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und der Abbau der FBPase nach alkalischer Lyse, SDS-PAGE und Western Blot mit FBPase-Antikörper detektiert.

Die Degradation von FBPase scheint im *Δblm3*-Deletionsstamm gegenüber dem Wildtyp geringfügig beschleunigt zu sein. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der *in vitro*-Aktivitätstests, aus denen sich eine leichte inhibitorische Wirkung des Proteins Blm3 ableiten lässt.

5.7.2 Degradation der ERAD-Substrate CPY* und CTG*

Zur weiteren Untersuchung der proteasomalen Degradation in $\Delta blm3$ -Zellen wurde der Abbau der ERAD-Substrate CPY* und CTG* gewählt, die über den Mechanismus der ER-assoziierten Degradation (ERAD) durch das Proteasom abgebaut werden. CPY* ist eine durch Mutation fehlgefaltete Form der Carboxypeptidase Y (CPY) (Hiller *et al.*, 1996). CTG* ist ein zu CPY* analoges Protein, das mit einem Membrananker versehen ist (Taxis *et al.*, 2003). Beide Proteine werden durch retrograden Transport aus dem ER in das Cytoplasma transloziert, wo sie durch das Proteasom degradiert werden. Die Degradation dieser Substratproteine wurde zunächst mithilfe eines Cycloheximid-Chases in Stämmen untersucht, die plasmidcodiertes CPY* und CTG* exprimierten (Abb. 22).

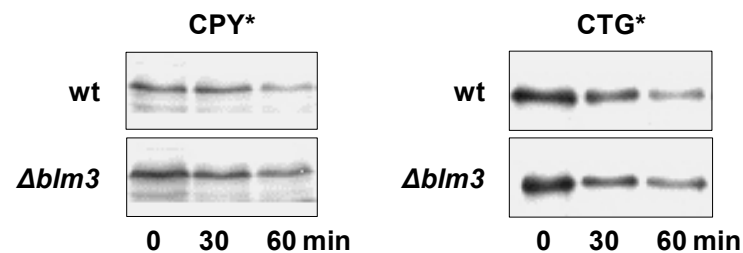


Abb. 22: CPY* und CTG* werden in $\Delta blm3$ - und Wildtyp-Zellen mit vergleichbarer Kinetik degradiert

Durch Zugabe von Cycloheximid wurde die Protein-Neusynthese in YPD-Kulturen mit einer OD_{600} von 2,0 unterbunden, bevor zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils 4OD Zellen entnommen und durch alkalische Lyse aufgeschlossen wurden. Nach SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Anfärbung der Membranen mit CPY-Antikörper.

Der Cycloheximid-Chase deutet auf einen dem Wildtyp vergleichbaren Abbau der Proteine CPY* und CTG* in der $\Delta blm3$ -Deletionsmutante hin. Um durch eine Quantifizierung mögliche feinere Unterschiede detektieren zu können, wurde die Degradation dieser Substrate durch Pulse Chase-Analysen untersucht. Dazu wurde die $\Delta blm3$ -Deletion in den Stamm *YWO0343* eingebracht, der CPY* chromosomal exprimiert. Da das nicht-essentielle Protein Blm3 die proteasomale Degradation allenfalls in geringem Maße zu beeinflussen scheint, wurde darüber hinaus eine analoge Doppel-Deletionsmutante hergestellt, in der neben *BLM3* auch das für das zu Blm3 homologe Protein Ymr247c codierende Gen deletiert ist. Dadurch sollte die Möglichkeit

ausgeschlossen werden, dass das zu Blm3 homologe Protein die Deletion von *BLM3* kompensiert und so die Detektion von Unterschieden zwischen Wildtyp und $\Delta blm3$ -Deletionsmutante erschwert. Nach radioaktiver Markierung der Proteine mit ^{35}S -Methionin/Cystein wurde der Chase durch Zugabe nicht-radioaktiven Methionin-haltigen Mediums gestartet. Der Abbau der radioaktiv markierten Proteine CPY* und CTG* wurde durch Probenentnahme zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt (Abb. 23).

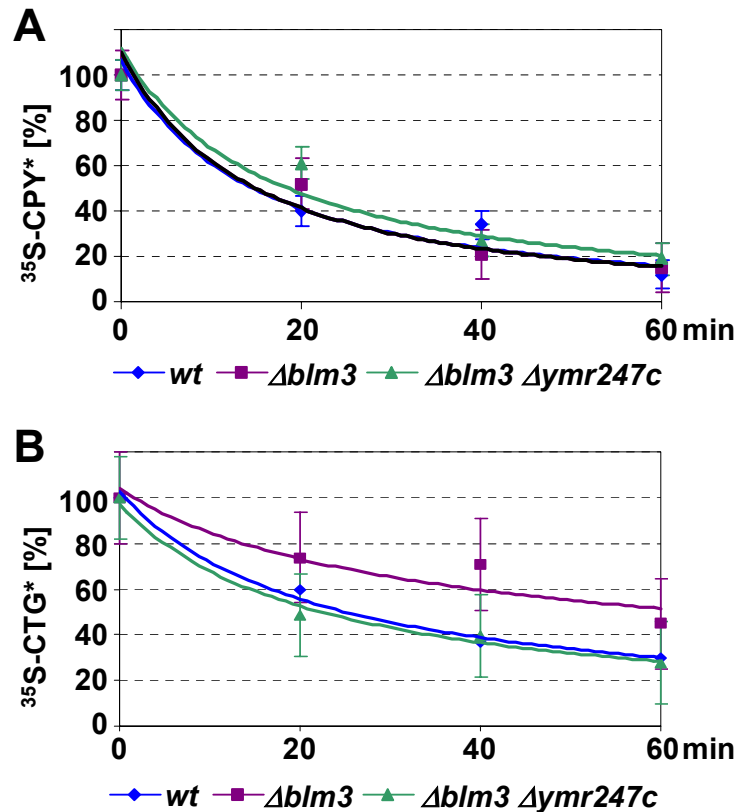


Abb. 23: $\Delta blm3$ - und $\Delta blm3 \Delta ymr247c$ -Zellen zeigen Wildtyp-Verhalten bezüglich der Degradation von CPY* und CTG*

Wildtyp-, $\Delta blm3$ - und $\Delta blm3 \Delta ymr247c$ -Zellen, die das fehlgefaltete Protein CPY* (A) bzw. CTG* (B) chromosomal exprimierten, wurden mit ^{35}S -Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Durch Umsetzen der Zellen in nicht-radioaktives Medium wurde der Chase initiiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mithilfe eines Phosphoimagers visualisiert und densitometrisch quantifiziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei (A), drei (B, $\Delta blm3 \Delta ymr247c$) bzw. fünf (B, $\Delta blm3$) unabhängigen Experimenten.

Die Degradation des radioaktiv markierten Proteins CPY* erfolgt in $\Delta blm3$ - und $\Delta blm3 \Delta ymr247c$ -Zellen mit einer Kinetik, die der von Wildtyp-Zellen gleicht (Abb. 23A). Die Kinetik der Degradation des radioaktiv markierten Proteins CTG* ist in

Abm3Δymr247c-Zellen vergleichbar mit der Kinetik in Wildtyp-Zellen, in *Abm3*-Zellen erscheint sie dagegen zunächst leicht verlangsamt (Abb. 23B). Unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichungen, die auf die schwierige Extraktion des Membranproteins CTG* zurückzuführen sind, sowie der Tatsache, dass bekannte ERAD-Mutanten eine nahezu völlig unterbundene Degradation zeigen (Plempers *et al.*, 1999a; Plempers *et al.*, 1999b) und dass *Abm3Δymr247c*-Zellen Wildtyp-Verhalten zeigen, kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die leicht verlangsamte Kinetik in *Abm3*-Zellen nicht auf einen Defekt dieser Mutante im ERAD-Mechanismus zurückzuführen ist. Eine leicht beschleunigte Degradation, wie sie für das cytosolische Substratprotein FBpase beobachtet wird, ließ sich für die Substrate CPY* und CTG* weder für *Abm3*- noch für *Abm3Δymr247c*-Zellen feststellen.

Da die Unfolded Protein Response (UPR) und ERAD kooperierende Mechanismen sind, zeigen ERAD-Mutanten in Kombination mit der Deletion des an der UPR beteiligten Gens *IRE1* synthetische Letalität bei erhöhter Temperatur (Friedlander *et al.*, 2000). Zur Kontrolle der durch die Pulse Chase-Analysen erhaltenen Ergebnisse wurden daher *Abm3Δire1*-Zellen hergestellt und hinsichtlich ihrer Temperatursensitivität mit *Δire1*-Zellen verglichen (Abb. 24). Da *Abm3Δire1*-Zellen keine synthetische Letalität zeigen, kann eine Beteiligung des Proteins Blm3 am Mechanismus der ER-assoziierten Degradation ausgeschlossen werden.

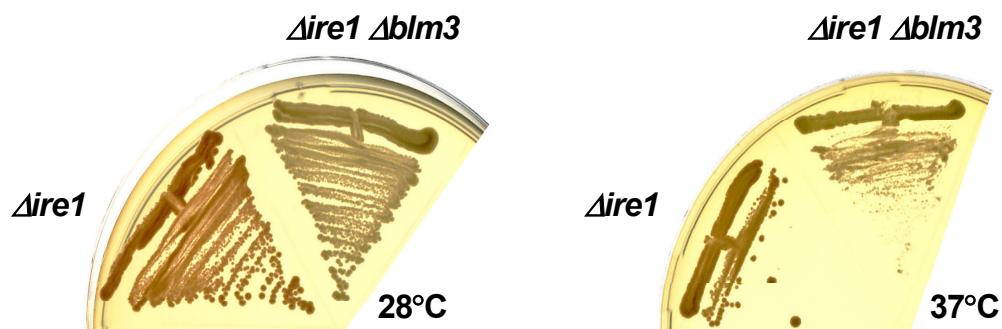


Abb. 24: *Abm3Δire1*-Zellen zeigen keine synthetische Letalität bei 37°C

Δire1- und *Δire1Δblm3*-Zellen wurden auf CM-Platten ausgestrichen und bei 28°C bzw. bei 37°C inkubiert.

5.8 Lokalisation des Proteasoms in *Abm3*

Über funktionelle, mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) markierte proteasomale Untereinheiten und Kernfraktionierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass in Hefe die Mehrzahl der 20S-Proteasomen und der 19S-Regulatoren im Kernhüllen/ER-Netzwerk lokalisiert ist (Enenkel *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 1998). Mithilfe von Kernlokalisierungssequenzen (NLS, Nuclear localisation signal), die sich an den N-Termini der α -Untereinheiten des 20S-Proteasoms befinden, werden proteasomale Vorläuferkomplexe über Importin α und Importin β in den Kern transportiert, wo sie vermutlich zu vollständigen 20S-Proteasomen assembliert und maturiert werden (Lehmann *et al.*, 2002). Der Übergang von proteasomalen Vorläuferkomplexen zum maturierten 20S-Proteasom geht vermutlich mit Konformationsänderungen in den N-terminalen Bereichen der α -Untereinheiten einherzugehen (Schmidtke *et al.*, 1997). Die Kernlokalisierungssequenzen der α -Untereinheiten scheinen nur in den proteasomalen 13-16S-Vorläuferkomplexen zugänglich zu sein (Lehmann *et al.*, 2002). Es ist denkbar, dass Proteasomen zur Regulation ihrer Lokalisation durch Adapterproteine an zelluläre Strukturen, wie z. B. an die innere oder äußere Kernmembran oder an das ER, gebunden werden. Falls Bm3 die Funktion eines solchen Adapterproteins besäße, sollte die Lokalisation von Proteasomen in der *Abm3*-Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp verändert sein. Zur Überprüfung der Lokalisation von Proteasomen und ihren Vorläuferkomplexen in der *Abm3*-Deletionsmutante wurde die Lokalisation verschiedener GFP-markierter 19S- und 20S-Untereinheiten sowie des Maturierungsfaktors Ump1 fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert (Abb. 25). Alle überprüften Untereinheiten und der Maturierungsfaktor Ump1 sind im *Abm3*-Deletionsstamm wie im Wildtyp im Zellkern lokalisiert. Daraus lässt sich schließen, dass unter normalen Wachstumsbedingungen das Protein Bm3 nicht an der Lokalisation des Proteasoms beteiligt ist. Da die *Abm3*-Deletionsmutante bei 28°C normales, bei 37°C aber deutlich verlangsamtes Wachstum aufweist (Abb. 16), wurde die Lokalisation der proteasomalen Untereinheiten und des Maturierungsfaktors Ump1 auch bei erhöhter Temperatur überprüft (Abb. 26, Abb. 27). Auch bei 37°C konnte keine Delokalisation des Proteasoms beobachtet werden. Um auszuschließen, dass ein Defekt in der Lokalisation des Proteasoms in der *Abm3*-Deletionsmutante durch das zu dem nicht-essentiellen Protein Bm3 homologe Protein Ymr247c kompensiert wird, wurde die Lokalisation der proteasomalen Untereinheiten

Rpn1 und Rpn11 auch für die Doppel-Deletionsmutante *Abm3Δymr247c* fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 28). In der Doppel-Deletionsmutante konnte ebenfalls keine Delokalisation der Proteasomen beobachtet werden. Das Protein Blm3 scheint unter normalen Wachstumsbedingungen weder bei normalen noch bei erhöhten Temperaturen einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteasoms zu besitzen.

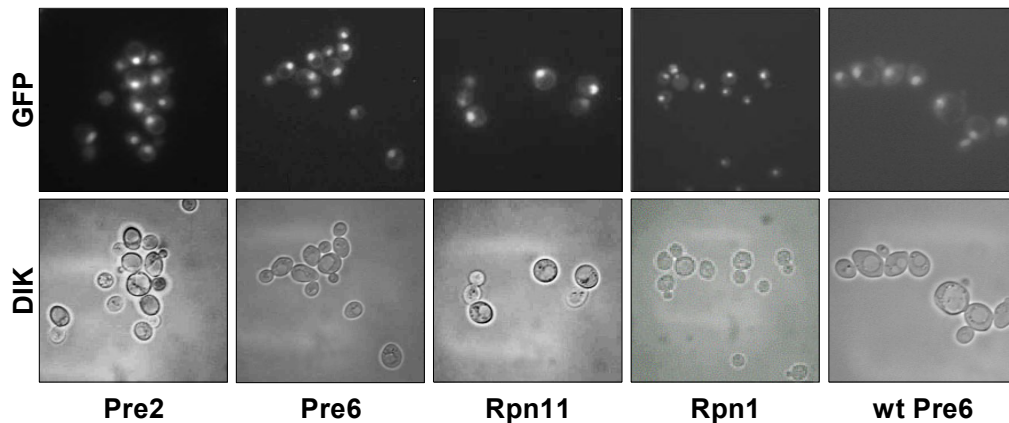


Abb. 25: Proteasomale Untereinheiten sind in *Abm3*-Zellen nukleär

Fluoreszenzmikroskopische Detektion der nukleären Lokalisation von Proteasomen in der *Abm3*-Deletionsmutante bei 28°C anhand der GFP-markierten 20S-Untereinheiten Pre6/α4 und Pre2/β5 sowie der 19S-Untereinheiten Rpn1 und Rpn11 und des Maturierungsfaktors Ump1. DIK: Differential-Interferenzkontrast.

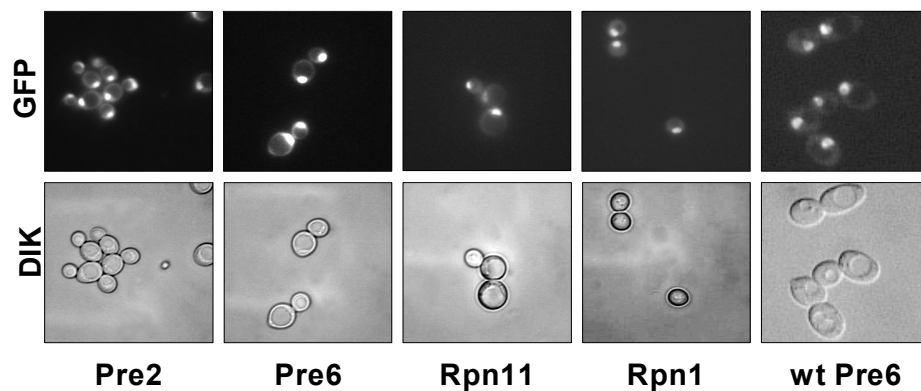


Abb. 26: Proteasomale Untereinheiten sind in *Abm3*-Zellen auch bei 37°C nukleär

Fluoreszenzmikroskopische Detektion der nukleären Lokalisation von Proteasomen in der *Abm3*-Deletionsmutante bei 37°C anhand der GFP-markierten 20S-Untereinheiten Pre6/α4 und Pre2/β5 sowie der 19S-Untereinheiten Rpn1 und Rpn11 und des Maturierungsfaktors Ump1. DIK: Differential-Interferenzkontrast.

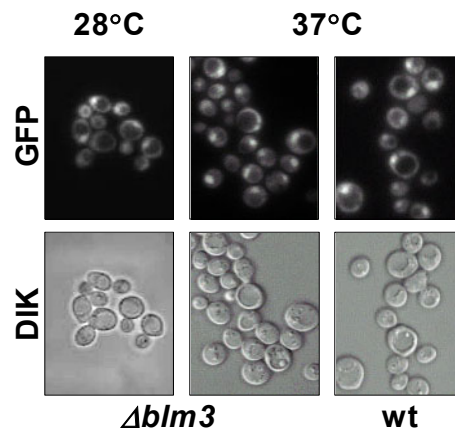


Abb. 27: Der Maturierungsfaktor Ump1 ist in $\Delta blm3$ -Zellen nukleär

Fluoreszenzmikroskopische Detektion der nukleären Lokalisation des GFP-markierten Maturierungsfaktors Ump1 in Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen bei 28°C und bei 37°C. DIK: Differential-Interferenzkontrast.

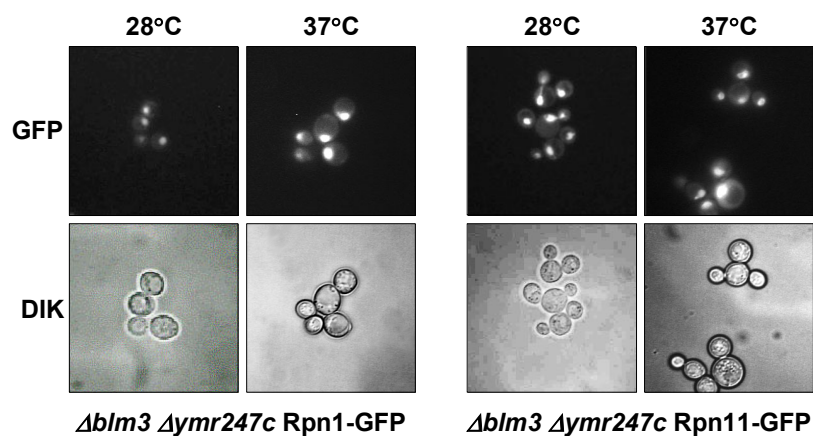


Abb. 28: Proteasomale Untereinheiten sind in $\Delta blm3 \Delta ymr247c$ -Zellen nukleär

Fluoreszenzmikroskopische Detektion der nukleären Lokalisation von Proteasomen in der $\Delta blm3 \Delta ymr247c$ -Doppel-Deletionsmutante bei 28°C anhand der GFP-markierten 19S-Untereinheiten Rpn1 und Rpn11. DIK: Differential-Interferenzkontrast.

5.9 Glycerin-Dichtegradienten

Proteasomen bilden in der Zelle keine einheitliche Population, vielmehr liegen sie in unterschiedlichen Komplexen vor. Glycerin-Dichtegradienten ermöglichen eine relativ grobe Auftrennung proteasomaler Komplexe in freie Untereinheiten, Vorläuferkomplexe und 26S-Proteasomen.

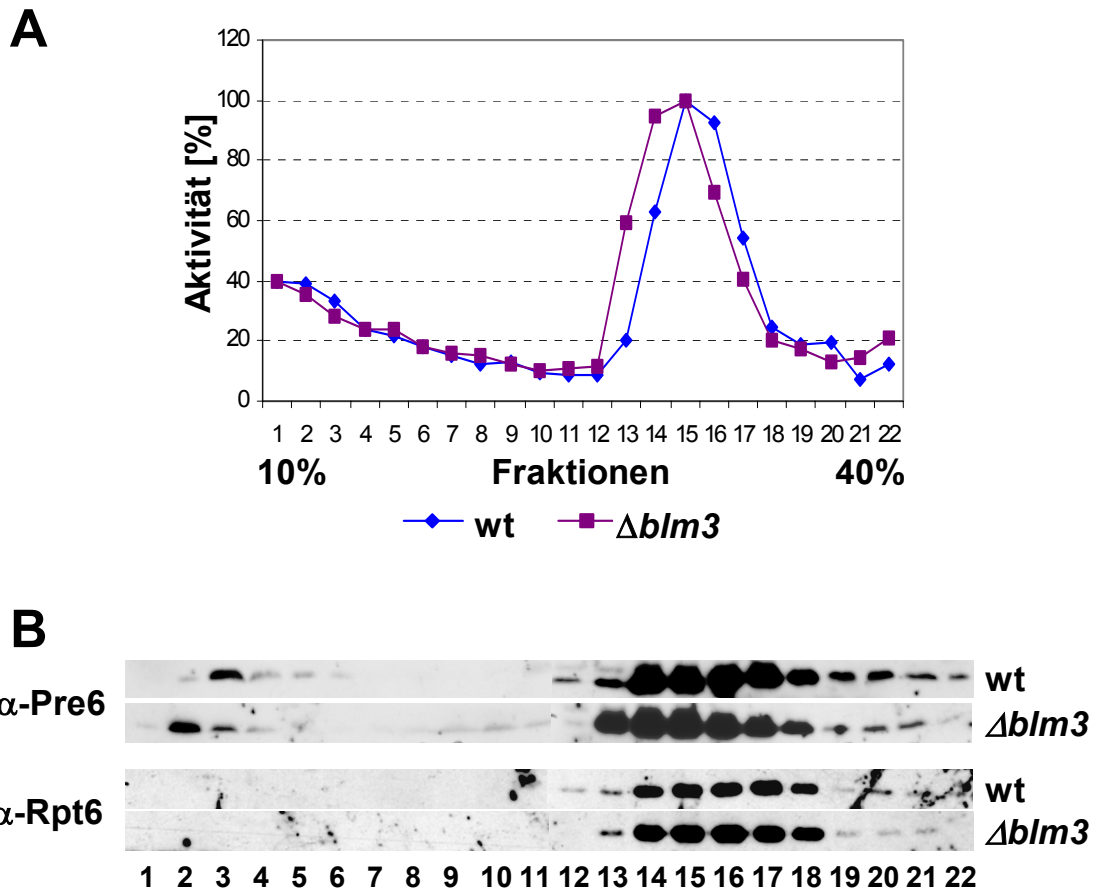


Abb. 29: Glycerin-Dichtegradienten zeigen gleiches Laufverhalten von proteasomaler Aktivität und proteasomalen Untereinheiten aus $\Delta blm3$ - und Wildtyp- Lysaten

A Gesamtllysate aus Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen wurden auf 10-40%ige Glycerin-Dichtegradienten aufgetragen und bei 40000rpm 16h ultrazentrifugiert. Die Bestimmung der Aktivität der von oben nach unten gesammelten Fraktionen erfolgte mithilfe des Substrats Cbz-Leu-Leu-Glu- β -Naphthylamid. Der höchste Aktivitätswert jeden Stammes wurde gleich 100% gesetzt. Bezogen auf den höchsten Aktivitätswert des Wildtyps liegt der Peak der Aktivität des $\Delta blm3$ -Stammes bei 93%. **B** Proteinproben jeder Fraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit Antikörpern gegen Pre6/ $\alpha 4$ und Rpt6/Cim3 inkubiert.

Die Untersuchung von Lysaten aus Wildtyp- und *Abm3*-Zellen durch Fraktionierung mithilfe eines Glycerin-Dichtegradienten sollte eine Aussage darüber liefern, ob zwischen diesen beiden Stämmen Unterschiede hinsichtlich der Verteilung proteasomaler Komplexe vorliegen.

Sowohl die Fraktionen von Lysaten aus Wildtyp- Zellen als auch die Fraktionen von Lysaten aus *Abm3*- Zellen zeigen die höchsten Aktivitätswerte in Fraktion 15 (Abb. 29A). Der Wert der Aktivität in Fraktion 15 ist für die Lysate aus Wildtyp-Zellen und die Lysate aus *Abm3*-Zellen vergleichbar, die proteasomale Aktivität in Lysaten aus *Abm3*-Zellen ist gegenüber der Aktivität in Lysaten aus Wildtyp-Zellen weder aktiviert noch inhibiert. Auch die proteasomale 20S α -Untereinheit Pre6/ α 4 und die 19S-Untereinheit Rpt6/Cim3 zeigen in den Fraktionen des Glycerin-Dichtegradienten von Lysaten aus Wildtyp- und *Abm3*-Zellen eine übereinstimmende Verteilung (Abb. 29B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass hinsichtlich der Aktivität und der Zusammensetzung proteasomaler Komplexe keine gravierenden, durch den Glycerin-Dichtegradienten erfassbaren Unterschiede zwischen Lysaten aus Wildtyp- und *Abm3*-Zellen bestehen.

5.10 Zusammensetzung von Proteasomen in wt- und *Abm3*-Zellen

Um zu überprüfen, ob zwischen Proteasomenpräparationen aus Wildtyp- und aus *Abm3*-Zellen Unterschiede hinsichtlich ihrer Zusammensetzung oder hinsichtlich weiterer assoziierter Proteine bestehen, wurden die Proteasomenpräparationen sowohl durch SDS-PAGE als auch durch 2D-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden Proteasomen aus Wildtyp- bzw. *Abm3*-Stämmen isoliert, in denen die Protein A-markierte Untereinheit Pre6/ α 4 anstelle des endogenen Proteins exprimiert wird. Die Proteasomenpräparation erfolgte affinitätschromatographisch an IgG-Sepharose. Durch die SDS-PAGE der präparierten Proben konnten keine Unterschiede zwischen Proteasomen aus Wildtyp- und *Abm3*-Zellen festgestellt werden (Abb. 30).

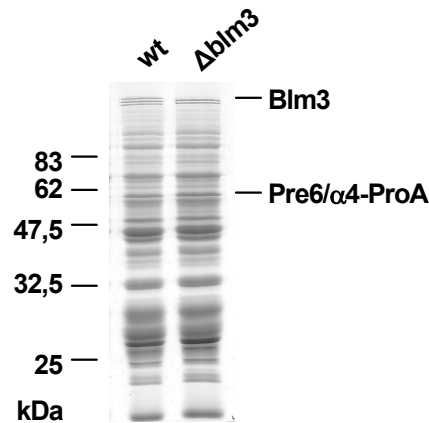


Abb. 30: Proteasomen-Präparationen aus Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen zeigen ein vergleichbares Bandenmuster

Die Präparation von Proteasomen erfolgte aus Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen, in denen die Protein A-markierte Untereinheit Pre/ α 4 anstelle des endogenen Proteins exprimiert wurde. Die Proteasomen wurden durch Affinitätschromatographie an IgG-Sephrose isoliert. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

Anschließend wurden die Proteasomenpräparationen der 2D-Gelelektrophorese unterzogen, da diese Methode eine bessere Auftrennung der Proteine ermöglicht (Abb. 31). Obwohl sich in den einzelnen Versuchen jeweils geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der proteasomalen Untereinheiten beobachten ließen, konnten keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta blm3$ -Deletionsmutante nachgewiesen werden. Die Beobachtung von Unterschieden zwischen den Proteasomenpräparationen aus Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen wird möglicherweise dadurch erschwert, dass hierbei Gemische proteasomaler Komplexe betrachtet werden, während das Protein Blm3 – entsprechend seines substöchiometrischen Auftretens in proteasomalen Präparationen (Abb. 11) – wahrscheinlich nur an einen kleinen Teil dieser Komplexe assoziiert ist.

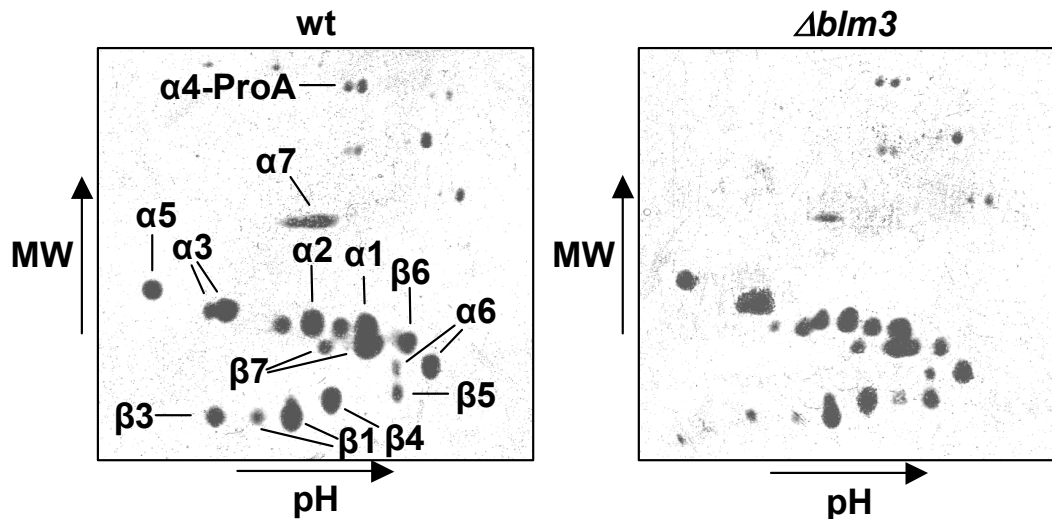


Abb. 31: Proteasomenpräparationen aus Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen zeigen keine Unterschiede im Proteinmuster

Über die Protein A-markierte Untereinheit $\alpha 4$ /Pre6 wurden Proteasomen durch Affinitätschromatographie an IgG-Sephrose isoliert. Die Auftrennung der Proteasomenpräparation erfolgte in der ersten Dimension durch NEPHGE, in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Durch Ausschneiden der Spots, tryptischen Verdau und Peptidmassenfingerprint-Analyse konnten alle 20S-Untereinheiten bis auf Pup1/ $\beta 2$ identifiziert werden. Obwohl dieser Versuch sechsmal durchgeführt wurde, lassen sich keine reproduzierbaren Unterschiede im Proteinmuster feststellen. Nach Prof. Dr. H. E. Meyer vom Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum sind bei konventioneller 2D-Elektrophorese über 100 Experimente nötig, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen (GBM-Herbsttagung, 10. September 2002, Halle).

5.11 Lokalisation von Blm3

Aufgrund zwölf potentieller Transmembrandomänen wird Blm3 in der *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>) als potentielles integrales Membranprotein bezeichnet. Da Blm3 auch in Proteasomen-Präparationen, die ohne Detergens durchgeführt wurden, vorliegt, kann eine membranständige Lokalisation des Proteins ausgeschlossen werden (Abb. 11). Die N-terminale NLS (nuclear localization signal)-Sequenz lässt eine Kernlokalisierung von Blm3 erwarten. Zur Untersuchung der Lokalisation des Proteins Blm3 wurde dieses chromosomal mit einem GFP- und einer HA-Markierung versehen (Abb. 32).

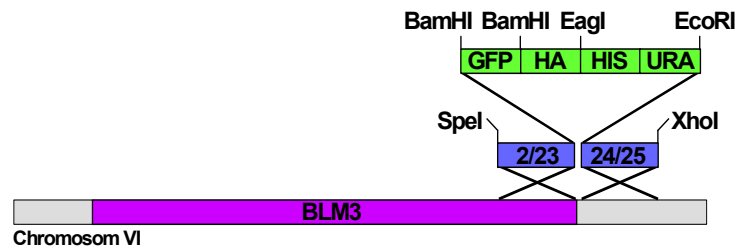


Abb. 32: Skizze zur Herstellung des Stamms *Blm3-GFP-HA*

Durch homologe Rekombination wurde das *BLM3*-Gen chromosomal mit einem GFP- und einer HA-Tag versehen. Dazu wurden die PCR-Fragmente 2/23 (Primer 2 und 23) und 24/25 (Primer 24 und 25) hergestellt und in dem Vektor pSL1190 mit den Genen GFP und HA aus pBSFlu sowie den Auxotrophiemarkern *HIS3* und *URA3* aus pBSHU zusammengesetzt. Das Integrationskonstrukt wurde mit *SpeI* und *XhoI* ausgeschnitten und über die zum 3'-Ende (2/23) bzw. zum Bereich strangabwärts des 3'-Endes von *BLM3* (24/25) homologen Bereiche von jeweils etwa 60bp Länge durch homologe Rekombination in den Wildtyp-Stamm *WCGa* integriert.

Der so erhaltene Stamm *BLM3-GFP-HA* wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht und zeigt eine nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins Blm3-GFP-HA (Abb. 33).

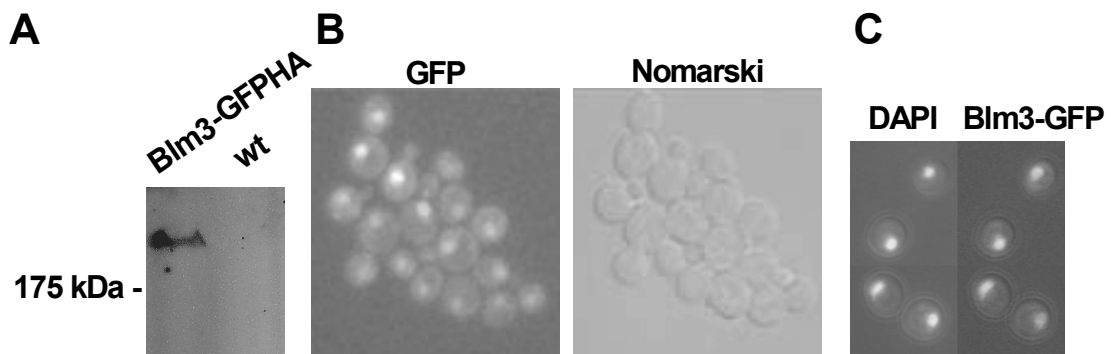


Abb. 33: GFP-markiertes Blm3 ist im Zellkern lokalisiert

A Die Western Blot-Analyse des Stamms *BLM3-GFP-HA* mit anti-GFP-Antikörpern zeigt die Expression des Fusionsproteins Blm3-GFP-HA. **B** Durch direkte Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen des Stamms *BLM3-GFP-HA* lässt sich die nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins Blm3-GFP-HA erkennen. **C** Vergleich mit DAPI gefärbter Zellkerne mit der Blm3-GFP-Fluoreszenz.

Die Fraktionierung von Zellen des *BLM3-GFP-HA*-Stammes zeigt nach SDS-PAGE, Western-Blot und Anfärben der Membran mit HA-Antikörpern sowie mit Antikörpern gegen cytoplasmatische (PFK, Phosphofructokinase) und nukleäre (Nups,

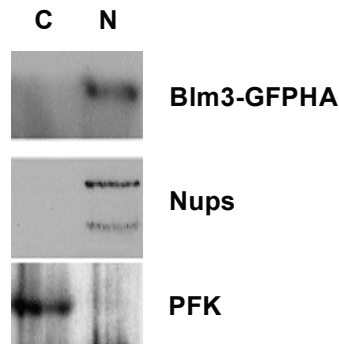


Abb. 34: Blm3-GFP-HA ist nach biochemischer Fraktionierung im Zellkern nachweisbar

Nach biochemischer Fraktionierung von sphäroplastierten Zellen des Stamms *BLM3-GFP-HA* in eine cytoplasmatische (C) und eine nukleäre Fraktion (N) lässt sich nach SDS-PAGE und Western Blot-Analyse die nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins Blm3-GFP-HA nachweisen. Als cytosolische Markerproteine wurden Nukleoporine (Nups), als nukleäres Markerprotein wurde Phosphofructokinase (PFK) verwendet. Blm3-GFP-HA wurde mit Antikörpern gegen HA nachgewiesen (aus: Fehlker *et al.*, 2003; Abb. von C. Enenkel).

Nucleoporine) Markerproteine die nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins Blm3-GFP-HA (Abb. 34).

Die Ergebnisse aus der direkten Fluoreszenzmikroskopie und der Zellfraktionierung sprechen eindeutig für eine nukleäre Lokalisation des Proteins Blm3, wie sie auch aufgrund der in der Proteinsequenz vorhandenen NLS-Sequenz zu erwarten ist. Damit stimmt die Lokalisation des Proteins Blm3 nicht nur mit der Lokalisation des überwiegenden Teils der Proteasomen in Hefe, sondern auch mit der Lokalisation des humanen Homologen PA200 überein (Ustrell *et al.*, 2002). Die mit der Lokalisation des Proteasoms übereinstimmende Lokalisation von Blm3-GFP-HA ist ein erster Hinweis auf die Funktionalität des Fusionsproteins. Einen weiteren Anhaltspunkt hierfür liefert die nachfolgend beschriebene Glycerin-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.

5.12 Blm3 und Blm3-GFP-HA im Glycerin-Dichtegradienten

Der Vergleich des Laufverhaltens des Fusionsproteins Blm3-GFP-HA mit dem Laufverhalten des endogenen Proteins Blm3 im Glycerin-Dichtegradienten sollte einen weiteren Beleg für die Funktionalität des Fusionsproteins liefern. Weiterhin soll das Laufverhalten von Blm3 mit dem Laufverhalten des 26S-Proteasoms und Ump1-assoziiierter proteasomaler Vorläuferkomplexe verglichen werden. Dazu wurden die

Gesamtlysate von Wildtyp-Stämmen, die Ump1-HA bzw. Blm3-GFP-HA anstelle des jeweiligen endogenen Proteins exprimierten, auf 10-40%ige Glycerin-Dichtegradienten geladen und ultrazentrifugiert. Nach 16h Zentrifugation bei 40.000rpm wurden mit den erhaltenen Fraktionen Aktivitätstests durchgeführt. Nach SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der einzelnen Fraktionen wurden die Proteine Blm3, Blm3-GFP-HA und Ump1-HA mit Antikörpern gegen Blm3 bzw. HA detektiert (Abb. 35). Der Peak des Blm3-Signals ist wie der Peak des Blm3-GFP-HA-Signals in den Fraktionen 12-14 zu beobachten. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf die Funktionalität des Fusionsproteins. Die Signalpeaks der Proteine Blm3 und Blm3-GFP-HA erscheinen

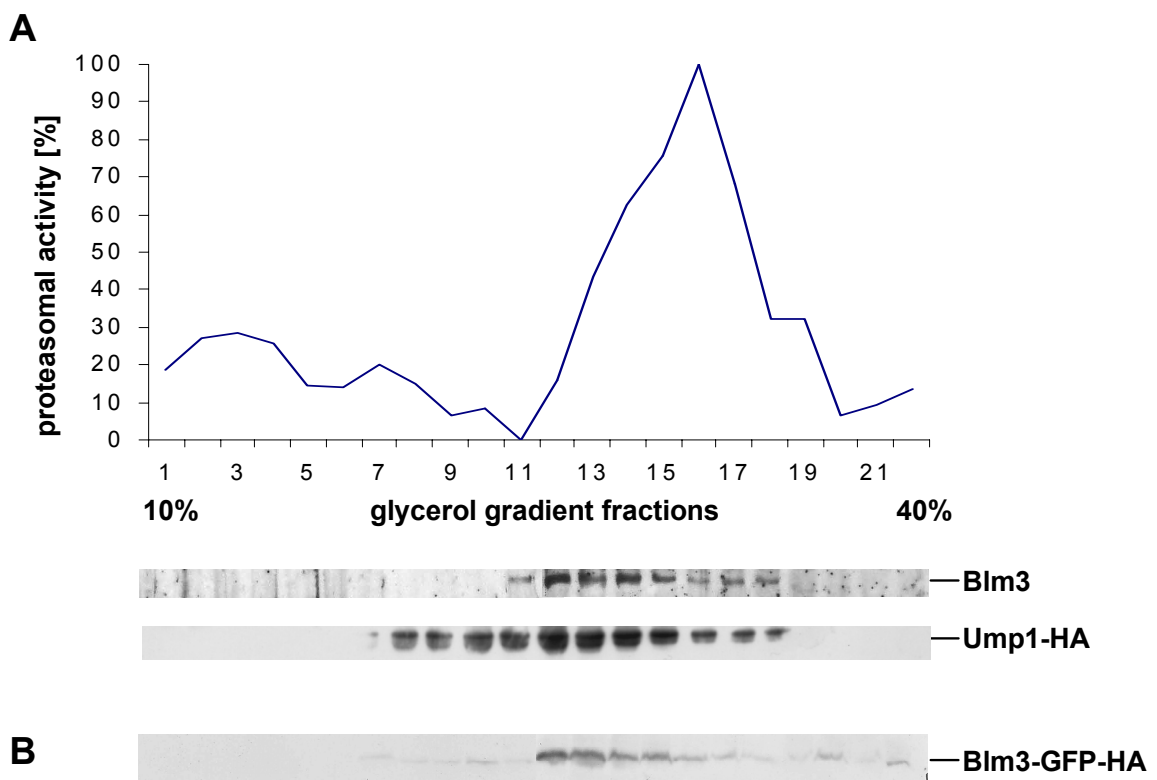


Abb. 35: Blm3 läuft im Glycerin-Dichtegradienten mit Ump1-HA, nicht mit der proteasomalen Aktivität

A Gesamtlysate von Wildtyp-Zellen, die Ump1-HA anstelle des endogenen Proteins exprimieren, wurden der 10-40%igen Glycerin-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation unterzogen. Die Aktivität der von oben nach unten gesammelten Fraktionen wurde mithilfe des Substrats Cbz-Leu-Leu-Glu- β -Naphthylamid gemessen. Proteinproben jeder Fraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit Antikörpern gegen Blm3 und HA inkubiert. **B** Gesamtlysate von Wildtyp-Zellen, die Blm3-GFP-HA anstelle des endogenen Proteins exprimierten, wurden wie oben beschrieben der Glycerin-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation unterzogen. Die geblotteten Proteinproben wurden mit Antikörpern gegen HA inkubiert.

in leichteren Fraktionen als der Aktivitätspeak des 26S-Proteasoms. Zusammen mit der Beobachtung, dass Blm3 in Proteasomenpräparationen substöchiometrisch vorliegt (vgl. Abb. 11), lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass Blm3 mit proteasomalen Komplexen assoziiert vorliegt, die nicht den aktiven 26S-Proteasomen entsprechen. Das Laufverhalten der Proteine Blm3 und Blm3-GFP-HA im Glycerin-Dichtegradienten entspricht dem Laufverhalten des Maturierungsfaktors Ump1, der an proteasomale Vorläuferkomplexe gebunden vorliegt und dessen Peak ebenfalls in den Fraktionen 12-14 zu beobachten ist (Lehmann *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 1998).

5.13 Nicht-denaturierende PAGE von Wildtyp und *Δblm3*

Die Methode der nicht-denaturierenden PAGE stellt eine Möglichkeit dar, Gemische aus Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen nach ihrer Grösse, Form und Ladung aufzutrennen. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung lassen sich proteolytisch aktive proteasomale Komplexe nach Überschichtung des nicht-denaturierenden Gels mit fluorogenen Peptidsubstraten mithilfe von UV-Licht detektieren (Glickman *et al.*, 1998a). In den folgenden Abschnitten werden nicht-denaturierende Gele gezeigt, die mit unterschiedlichen Proteinpräparationen angefertigt wurden. Um einen Vergleich der Gele untereinander zu ermöglichen, wurde zur Beschriftung der Banden folgende Systematik angewandt: Banden, die gleiches Laufverhalten zeigen, erhalten jeweils die gleiche Ziffer. Ein voranstehender Buchstabe gibt die verwendete Proteinpräparation an. Dabei steht „L“ für „Lysat“, „P“ für „Proteasomen-Präparation“ und „U“ für „Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexe“.

Nach der nicht-denaturierenden PAGE von Lysaten aus Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen und anschließender Überschichtung mit fluorogenen Peptidsubstraten zeigt sich im Lysat des Wildtyps oberhalb der Bande L3, die in der Literatur als 20S-Komplex beschrieben ist, eine schwache, bisher nicht charakterisierte Bande, die im Lysat der *Δblm3*-Deletionsmutante nicht detektierbar ist. Dieser Befund deutet darauf hin, dass im Wildtyp ein proteasomaler Komplex vorliegt, der in der *Δblm3*-Deletionsmutante entweder nicht proteolytisch aktiv oder nicht vorhanden ist.

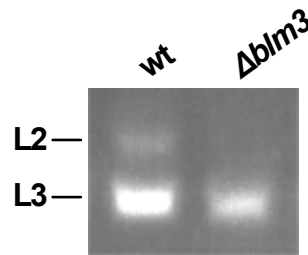


Abb. 36: Aktivitäts-Überschichtungstest der Lysate aus Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen in nicht-denaturierenden Gelen

Gesamtlysate aus Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen wurden nach nicht-denaturierender PAGE mit dem fluorogenen Peptidsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in Gegenwart von 0,05% SDS überschichtet. Nach Inkubation bei 37°C ließ sich die Fluoreszenz mithilfe von UV-Licht detektieren. Die Banden in der nicht-denaturierenden PAGE aus Lysaten werden mit „L“ bezeichnet. Der Übersichtlichkeit halber werden Banden gleichen Laufverhaltens in den verschiedenen Nativgel-Abbildungen (Abb. 36-Abb. 41) jeweils mit gleicher Ziffer benannt. Oberhalb der Bande L3 ist für das Lysat aus Wildtyp-Zellen eine Bande zu beobachten (Bande L2), die für das Lysat aus *Δblm3*-Zellen nicht detektierbar ist.

Um festzustellen, ob es sich bei der in dem Lysat der *Δblm3*-Deletionsmutante nicht detektierbaren Bande L2 um einen proteasomalen Komplex handelt, der in *Δblm3*-Zellen proteolytisch inaktiv ist, oder ob dieser proteasomale Komplex in der *Δblm3*-Deletionsmutante nicht vorhanden ist, wurde die nicht-denaturierende PAGE mit nativen Proteasomenpräparationen aus den Stämmen *WCGa PRE6-GFP-Strep* und *Δblm3 PRE6-GFP-Strep* wiederholt. Gleichzeitig konnte durch die Verwendung von Proteasomenpräparationen die Konzentration der Proben erhöht und eine Verunreinigung durch nicht-proteasomale Proteasen weitgehend ausgeschlossen werden. In den hierzu verwendeten Stämmen ist die 20S-Untereinheit Pre6/α4 sowohl mit einem GFP- als auch mit einer Streptavidin (Strep)-Markierung versehen. Die Streptavidin-Markierung ermöglicht die Präparation nativer Proteasomen durch Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose. Die GFP-Markierung ermöglicht die Visualisierung proteasomaler Komplexe im Nativgel unabhängig von ihrer proteolytischen Aktivität durch die Detektion der GFP-Fluoreszenz mithilfe eines Phosphorfluoro-Imagers.

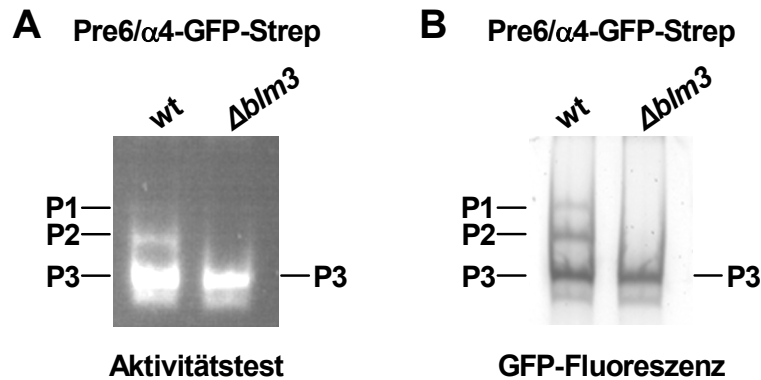


Abb. 37: Wildtyp-Zellen enthalten einen proteasomalen Komplex, der in $\Delta blm3$ -Zellen nicht vorhanden ist

Über die GFP-Strep-markierte Untereinheit Pre6/α4 wurden aus Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen proteasomale Komplexe nativ präpariert und der nicht-denaturierenden PAGE unterzogen. Die Banden des Nativgels von über Pre6/α4 präparierten proteasomalen Komplexen werden mit „P“ gekennzeichnet. Der Übersichtlichkeit halber werden Banden gleichen Laufverhaltens in den verschiedenen Nativgel-Abbildungen (Abb. 36-Abb. 41) jeweils mit gleicher Ziffer benannt. **A** Durch den Aktivitäts-Überschichtungstest sind in der Proteasomenpräparation aus dem Wildtyp oberhalb von Bande P3 die Komplexe P1 und P2 detektierbar, die in der Proteasomenpräparation aus $\Delta blm3$ -Zellen keine proteolytische Aktivität zeigen. **B** Die mithilfe eines Phosphorfluoro-Imagers visualisierte GFP-Fluoreszenz zeigt, dass die Komplexe P1 und P2 in der $\Delta blm3$ -Deletionsmutante nicht vorhanden sind.

Nach der Übersichtung des nicht-denaturierenden Gels der nativen Proteasomenpräparationen mit dem fluorogenen Peptidsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC lassen sich unter UV-Licht für die Wildtyp-Probe drei proteasomale, proteolytisch aktive Komplexe detektieren (Abb. 37A). Der Komplex P3 zeigt im Aktivitäts-Überschichtungstest die stärkste Fluoreszenz und entspricht in seinem Laufverhalten dem Komplex L3 in dem nicht-denaturierenden Gel aus Lysaten (vgl. Abb. 36). Aufgrund ihrer Lage und ihrer starken proteolytischen Aktivität wird diese Bande in publizierten Nativgelen (Bajorek *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2003) dem 20S-Komplex zugeordnet. Die Komplexe P1 und P2 zeigen ein langsames Laufverhalten als der Komplex P3. Beide weisen im Aktivitäts-Überschichtungstest eine schwächere Fluoreszenz als der Komplex P3 auf, der Komplex P1 ist durch diese Methode kaum detektierbar. Für die Proteasomenpräparation aus $\Delta blm3$ -Zellen ist durch den Aktivitäts-Überschichtungstest des nicht-denaturierenden Gels nur die Bande P3 detektierbar. Durch die Anregung und Detektion der GFP-Fluoreszenzemission mithilfe eines

Phosphofluoro-Imagers werden die GFP-markierten proteasomalen Komplexe unabhängig von ihrer proteolytischen Aktivität visualisiert (Abb. 37B). Für die Proteasomenpräparation aus Wildtyp-Zellen sind hierbei wie durch den Aktivitäts-Überschichtungstest die Banden P1, P2 und P3 detektierbar, während für die Proteasomenpräparation aus *Δblm3*-Zellen, wie durch den Aktivitäts-Überschichtungstest, nur die Bande P3 gefunden wird. Demzufolge sind die Komplexe P1 und P2, die Bestandteile von Proteasomenpräparationen aus Wildtyp-Zellen sind, in den Proteasomenpräparationen aus *Δblm3*-Zellen nicht vorhanden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den Komplexen P1 und P2 um proteasomale Komplexe handelt, die nur in Gegenwart des Proteins Blm3 existent bzw. stabil sind. Durch den Vergleich der Intensitäten der Aktivitätssignale mit den Intensitäten der GFP-Fluoreszenz lässt sich erkennen, ob es sich bei den Komplexen P1 und P2, verglichen mit dem 20S-Komplex P3, um mehr oder weniger aktivierte Spezies handelt. Obwohl eine quantitative Aussage über die Aktivität nicht möglich ist, scheinen die proteolytischen Aktivitäten der Komplexe P1 und P2 gegenüber der Aktivität des Komplexes P3 geringfügig vermindert zu sein. Das Protein Blm3 übt demzufolge keine im nicht-denaturierenden Gel detektierbare aktivierende Wirkung auf die proteolytische Aktivität der Komplexe P1 und P2 aus. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Aktivitätstests, durch die eine leichte inhibitorische Wirkung des Proteins Blm3 nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen zeigen sich in den von Ustrell *et al.* veröffentlichten nicht-denaturierenden Gelen die mit dem zu Blm3 homologen Protein PA200 assoziierten proteasomalen Komplexe als Spezies mit erhöhter proteolytischer Aktivität, was in Übereinstimmung mit den dort durchgeführten *in vitro*-Aktivitätstests steht (Ustrell *et al.*, 2002). Im Folgenden werden die durch die nicht-denaturierende PAGE detektierten Komplexe P2 und P3 charakterisiert. Die Charakterisierung des Komplexes P1 ist aufgrund der geringen Proteinmenge nicht möglich.

5.14 Charakterisierung der Nativgelbanden der Proteasomenpräparationen

Zur Charakterisierung der proteasomalen Komplexe, die zum Auftreten der Banden P2 und P3 in der nicht-denaturierenden PAGE von Proteasomenpräparationen führen (vgl.

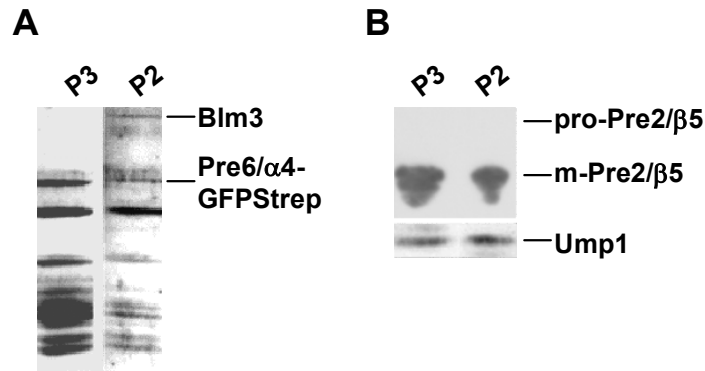


Abb. 38: Blm3 ist an einen proteasomalen Komplex assoziiert, der den Maturierungsfaktor Ump1 enthält

Nach der nicht-denaturierenden PAGE von Proteasomenpräparationen aus Wildtyp-Zellen wurden die Banden P2 und P3 (vgl. Abb. 37) ausgeschnitten und durch SDS-PAGE aufgetrennt. **A** Die Coomassie-Färbung zeigt für die Komplexe P2 und P3 ein proteasomales Muster, für Bande P2 zusätzlich das hochmolekulare Protein Blm3, das durch Peptidmassenfingerprint-Analyse identifiziert wurde. **B** Nach dem Western Blot wurde die Membran mit Antikörpern gegen Pre2/β5 und Ump1 inkubiert. (Abb. von A. Lehmann).

Abb. 37), wurden diese Banden aus dem nicht-denaturierenden Gel ausgeschnitten und durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 38A).

Die Coomassie-Färbung des SDS-Gels zeigt sowohl für den Komplex P3 als auch für den Komplex P2 ein proteasomales Muster (Abb. 38A). Der Komplex P2 enthält zusätzlich zu den Banden proteasomaler Untereinheiten das Protein Blm3. Entsprechend der geringeren Proteinmenge des Komplexes P2 gegenüber dem Komplex P3 in der nicht-denaturierenden PAGE (vgl. Abb. 37) zeigt auch die Coomassie-Färbung des SDS-Gels für die aus der Bande P2 stammenden proteasomalen Banden eine geringere Proteinmenge als für die aus der Bande P3 stammenden. Während Blm3 in Proteasomenpräparationen substöchiometrisch vorliegt (vgl. Abb. 11), scheint es ein stöchiometrischer Bestandteil des Komplexes P2 zu sein. Der Immunoblot mit Antikörpern gegen Pre2/β5 und Ump1 zeigt, dass sowohl der Komplex P2 als auch der Komplex P3 ausschließlich maturiertes Pre2 enthalten und dass in beiden Komplexen der Maturierungsfaktor Ump1 vorliegt. Durch den Vergleich der Intensitäten der m-Pre2/β5- und Ump1-Signale mit den Proteinmengen in der Coomassie-Färbung wird ersichtlich, dass der Komplex P3 – entsprechend der größeren Proteinmenge der Bande P3 – ein deutlich stärkeres m-Pre2/β5-Signal zeigt als der Komplex P2, während das Ump1-Signal des Komplexes P3 schwächer ist als das des Komplexes P2. Dies lässt

darauf schließen, dass möglicherweise nur ein Teil des Komplexes P3 Ump1 enthält. Während bisher davon ausgegangen wurde, dass es sich bei dem Komplex P3 ausschließlich um maturiertes 20S-Proteasom handelt (Bajorek *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2003), zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass der Komplex P3 zumindest teilweise den Maturierungsfaktor Ump1, allerdings kein pro-Pre2/ β 5 enthält. In einem späten Schritt der Assemblierung des Proteasoms werden zwei mit Ump1 assoziierte Vorläuferkomplexe, auch Halbproteasomen genannt, zum Präholoproteasom zusammengefügt (Ramos *et al.*, 1998; vgl. Abb. 5). Die Prozessierung von pro-Pre2/ β 5 ist direkt an die Bildung von 20S-Proteasomen aus zwei Halbproteasomen-Vorläuferkomplexen gekoppelt, da zur Ausbildung des aktiven Zentrums, das für die autokatalytische Prozessierung von pro-Pre2/ β 5 benötigt wird, proPre2/ β 5 des einen Halbproteasoms und Pre1/ β 4 des zweiten Halbproteasoms nebeneinander positioniert sein müssen (Heinemeyer, 2000). Nach der Maturierung der proteolytisch aktiven Untereinheiten wird Ump1 als erstes Substrat im Inneren des gerade entstehenden 20S-Proteasoms degradiert. Das gerade entstehende, naszierende Proteasom unterscheidet sich vom reifen 750kDa großen 20S-Komplex nur durch das Vorhandensein des 16kDa-Proteins Ump1. In der nicht-denaturierenden PAGE, durch die Komplexe entsprechend ihrer Größe, Ladung und Form aufgetrennt werden, ist das naszierende Proteasom vom maturierten 20S-Komplex daher nicht zu unterscheiden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die Bande P3 (Abb. 37, Abb. 38) aus einem Gemisch von zwei nahezu identischen Komplexen zusammensetzt: aus dem naszierenden, Ump1-enthaltenden Proteasom und dem vollständig maturierten 20S-Proteasom, das kein Ump1 mehr enthält. Auch der Komplex P2 enthält Ump1 und ausschließlich maturiertes Pre2/ β 5, zeigt aber in der nicht-denaturierenden PAGE ein langsames Laufverhalten als das Komplexgemisch P3. Das Vorhandensein des Proteins Blm3 in dem Komplex P2 lässt darauf schließen, dass der Komplex P2 ein naszierendes Proteasom darstellt, das im Unterschied zu dem naszierenden Proteasom aus dem Komplex P3 an das Protein Blm3 assoziiert vorliegt.

5.15 Assoziation von Blm3 an proteasomale Vorläuferkomplexe

Die aufgrund des vergleichbaren Laufverhaltens von Blm3 und dem Maturierungsfaktor Ump1 im Glycerin-Dichtegradienten naheliegende Vermutung, Blm3 könnte mit proteasomalen Vorläuferkomplexen assoziiert vorliegen, konnte durch die

Charakterisierung der Nativgel-Banden von Proteasomenpräparationen durch SDS-PAGE bestätigt werden (Abb. 38). Zur Überprüfung der Assoziation von Blm3 an Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe wurden über den Protein A-markierten Maturierungsfaktor Ump1 proteasomale Vorläuferkomplexe aus Wildtyp-Zellen affinitätschromatografisch über IgG-Sepharose isoliert und durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 39, P. Wendler).

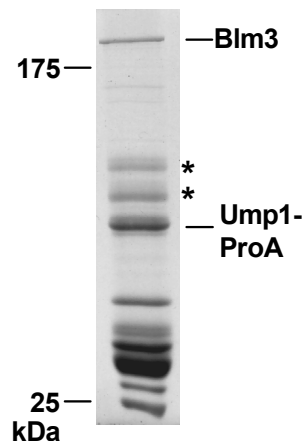


Abb. 39: Blm3 ist Bestandteil Ump1-assoziiierter proteasomaler Vorläuferkomplexe

Mit dem Protein A-markierten Maturierungsfaktor Ump1 assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe aus Wildtyp-Zellen wurden durch Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose aus Kern/ER-Extrakten isoliert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend Coomassie-gefärbt. Blm3 wurde durch Peptidmassenfingerprint-Analyse identifiziert. Bei den durch Sternchen gekennzeichneten Banden handelt es sich um Heat Shock-Proteine (aus Fehlker *et al.*, 2003; Abb. von P. Wendler).

Durch diesen Versuch wird deutlich, dass Blm3 an Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe assoziiert vorliegt.

5.16 Nativgele proteasomaler Vorläuferkomplexe

Zur weiteren Charakterisierung Blm3-assoziiierter Komplexe wurden Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe aus Wildtyp- und *Abm3*-Zellen nativ isoliert und durch nicht-denaturierende PAGE in Subkomplexe aufgetrennt. Native proteasomale Vorläuferkomplexe wurden aus Wildtyp- und *Abm3*-Zellen, in denen der Maturierungsfaktor Ump1 mit einem GFP- und einer Streptavidin-Markierung versehen ist, durch Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose und Elution mit

Desthiobiotin isoliert. Die GFP-Markierung ermöglicht die Detektion der Proteinbanden Ump1-enthaltender proteasomaler Vorläuferkomplexe durch Anregung und Detektion der GFP-Fluoreszenzemission mithilfe eines Phosphofluoro-Imagers.

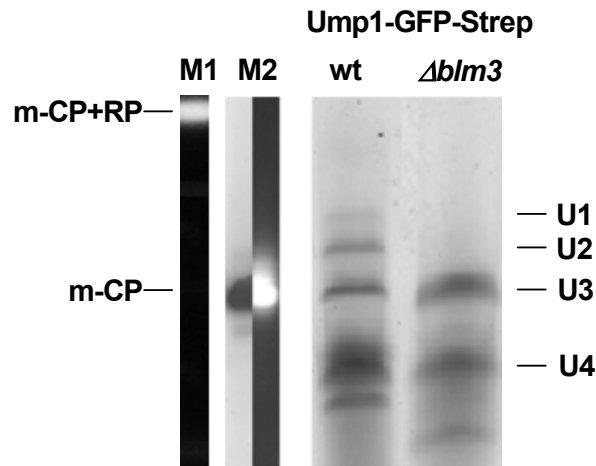


Abb. 40: Wildtyp-Zellen enthalten proteasomale Vorläuferkomplexe, die in $\Delta blm3$ -Zellen nicht vorhanden sind

Native Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe wurden aus Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen über den GFP- und Strep-markierten Maturierungsfaktor Ump1 durch Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose isoliert. Nach nicht-denaturierender PAGE wurde die GFP-Fluoreszenz der Ump1-assoziierten Vorläuferkomplexe mithilfe eines Phosphofluoro-Imagers detektiert. Die Banden des nicht-denaturierenden Gels von Ump1-assoziierten proteasomalen Vorläuferkomplexen werden mit „U“ gekennzeichnet. Der Übersichtlichkeit wegen sind Banden gleichen Laufverhaltens in den verschiedenen Abbildungen nicht-denaturierender Gele (Abb. 36-Abb. 41) jeweils mit gleicher Ziffer benannt. Als Marker M1 und M2 dienen zwei Proteasomenpräparationen: M1 (m-CP+RP; maturiertes Core Particle + Regulatory Particle) zeigt den Aktivitäts-Überschichtungstest des 26S-Proteasoms in der nicht-denaturierenden PAGE, M2 (m-CP) zeigt links die Fluoreszenzemission, rechts den Aktivitäts-Überschichtungstest eines GFP-markierten 20S-Proteasoms. (Abb. von A. Lehmann).

Die nicht-denaturierende PAGE Ump1-assoziiierter proteasomaler Vorläuferkomplexe führt sowohl für die aus Wildtyp-Zellen als auch für die aus $\Delta blm3$ -Zellen präparierten Proben zur Auftrennung in mehrere Subkomplexe (Abb. 40). Dabei haben die aus Wildtyp- und $\Delta blm3$ -Zellen präparierten Vorläuferkomplexe sowohl den Komplex U3 als auch den Komplex U4 gemeinsam, die gleichzeitig auch den überwiegenden Mengenanteil an Subkomplexen darstellen. Das Laufverhalten des Komplexes U3 in der nicht-denaturierenden PAGE ist mit dem Laufverhalten des maturierten 20S-Komplexes (vgl. Abb. 40, M2, m-CP) identisch. Der Komplex U3 zeigt ein deutlich langsames

Laufverhalten als der Komplex U4. Ein noch langsames Laufverhalten weisen die Komplexe U1 und U2 auf. Die Ump1-assoziierten Vorläuferkomplexe U1, U2 und U3 entsprechen in ihrem Laufverhalten und in den vorliegenden Proteinmengen den bei der nicht-denaturierenden PAGE proteasomaler Präparationen aus Wildtyp-Zellen beobachteten Komplexe P1, P2 und P3 (vgl. Abb. 37). Ein dem Vorläuferkomplex U4 entsprechender Komplex ist in den proteasomalen Präparationen nicht zu beobachten. Die Komplexe U1 und U2 zeigen analoges Verhalten zu den Komplexen P1 und P2: Die Ump1-assoziierten Vorläuferkomplexe U1 und U2 sind nur in der Präparation Ump1-assoziiierter proteasomaler Vorläuferkomplexe aus Wildtyp-Zellen, nicht aber in der Präparation aus *Abm3*-Zellen vorhanden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den Komplexen U1 und U2 um Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe handelt, die nur in Gegenwart des Proteins Blm3 existent bzw. stabil sind. Im Folgenden werden die Vorläuferkomplexe U1, U2, U3 und U4 durch Immunoblot des nicht-denaturierenden Gels und durch Analyse der Banden des nicht-denaturierenden Gels mithilfe von SDS-PAGE und Western Blot charakterisiert.

5.17 Charakterisierung proteasomaler Vorläuferkomplexe

Zur Charakterisierung der Ump1-assoziierten Vorläuferkomplexe wurden Immunoblots des nicht-denaturierenden Gels mit Antikörpern gegen Blm3, GFP und Pre2/β5 angefertigt. Der Immunoblot des nicht-denaturierenden Gels Ump1-assoziiierter proteasomaler Vorläuferkomplexe aus Wildtyp-Zellen mit Peptidantikörpern gegen Blm3 zeigt, dass die Komplexe U1 und U2 das Protein Blm3 enthalten. Um die in der nicht-denaturierenden PAGE aufgetrennten Ump1-assoziierten proteasomalen Vorläuferkomplexe weiter zu charakterisieren, wurden die Banden der Komplexe U2, U3 und U4 aus dem nicht-denaturierenden Gel ausgeschnitten und durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 41A). Die Charakterisierung des Komplexes U1 ist aufgrund der geringen Proteinmenge nicht möglich.

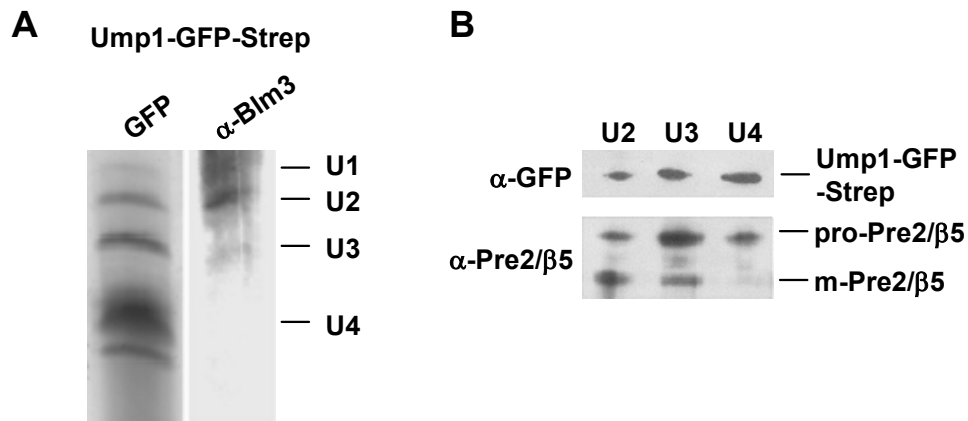


Abb. 41: Charakterisierung Ump1-assoziiierter proteasomaler Vorläuferkomplexe

Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe aus Wildtyp-Zellen wurden über den GFP- und Strep-markierten Maturierungsfaktor Ump1 durch Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose nativ isoliert. **A** Nach nicht-denaturierender PAGE wurde die GFP-Fluoreszenz Ump1-assoziiierter Vorläuferkomplexe über einen Phosphoimager detektiert (links) und ein Immunoblot mit Antikörpern gegen Blm3 durchgeführt (rechts). **B** Die Banden U2, U3 und U4 wurden aus dem nicht-denaturierenden Gel ausgeschnitten und der SDS-PAGE unterzogen. Nach anschließendem Western Blot wurden Ump1 und Pre2/β5 mithilfe von Antikörpern gegen GFP bzw. Pre2/β5 detektiert. (Abb. von A. Lehmann).

Anschließend wurde ein Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP und gegen Pre2/β5 durchgeführt (Abb. 41B). Alle drei Komplexe, U2, U3 und U4, enthalten erwartungsgemäss Ump1. Die Komplexe U2 und U3 enthalten sowohl pro-Pre2/β5 als auch m-Pre2/β5, wobei der Komplex U2 mehr m-Pre2/β5, der Komplex U3 dagegen mehr pro-Pre2/β5 enthält. Der Komplex U4 enthält ausschließlich pro-Pre2/β5. Er läuft im nicht-denaturierenden Gel deutlich schneller als das 20S-Proteasom und stellt den größten Anteil an Ump1-assoziierten Vorläuferkomplexen (vgl. Abb. 40). Während Ramos *et al.* vermuteten, dass es sich bei dem hauptsächlich vorliegenden Ump1-assoziierten Vorläuferkomplex um Halbproteasomen handelt, fand Braun, dass in diesem Komplex die Untereinheiten β6 und β7 noch nicht eingebaut sind (Ramos *et al.*, 1998; Braun, 2002). Die gleichzeitige Anwesenheit von pro- und m-Pre2/β5 in den Komplexen U2 und U3 ist ein Zeichen der gerade ablaufenden Prozessierung und damit charakteristisch für das in der Reifung begriffene, naszierende Proteasom. Während der Komplex U2 das hochmolekulare Protein Blm3 enthält (Abb. 41A) und dementsprechend ein langsames Laufverhalten zeigt als der 20S-Komplex (vgl. Abb. 40), ist Blm3 nicht an den Komplex U3 assoziiert, dessen Laufverhalten dem des 20S-

Komplexes entspricht. Folglich stellen die Komplexe U2 und U3 naszierende Proteasomen mit oder ohne assoziiertes Blm3 dar. Die Assoziation von Blm3 an naszierende Proteasomen, nicht aber an Halbproteasomen, lässt auf eine Beteiligung des Proteins an einem späten Schritt der Maturierung und Assemblierung schließen.

5.18 Proteasomale Maturierung in Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen

5.18.1 Gleichgewichtszustände der Maturierung von Pre2/β5

Um den Einfluss von Blm3 auf die proteasomale Maturierung zu untersuchen, wurden zunächst die Gleichgewichtszustände der Maturierung von Pre2/β5 in Lysaten aus Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen geprüft. Hierzu wurden in der frühlogarithmischen Wachstumsphase befindliche Kulturen von Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde HA-markiertes Pre2/β5 mithilfe von HA-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 42). Als Kontrolle diente der *Δump1*-Deletionsstamm, in dem die Prozessierung der β-Untereinheiten stark verlangsamt ist und daher wesentlich mehr pro-Pre2/β5 vorliegt als im Wildtyp (Ramos *et al.*, 1998).

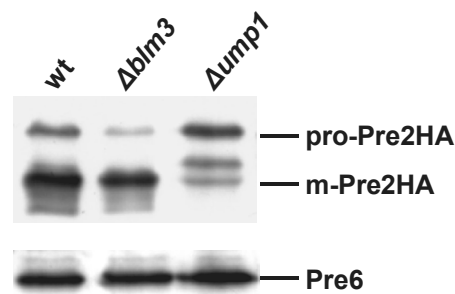


Abb. 42: *Δblm3*-Zellen enthalten weniger unprozessiertes Pre2/β5 als Wildtyp-Zellen

In der frühlogarithmischen Wachstumsphase befindliche Kulturen von Wildtyp-, *Δblm3*- und *Δump1*-Zellen, in denen die β-Untereinheit Pre2/β5 HA-markiert vorlag, wurden bei einer optischen Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von 1,0 geerntet und durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde der Blot mit Antikörpern gegen HA und Pre6/α4 inkubiert.

Zur Ladungskontrolle wurden die Blots zusätzlich mit Antikörpern gegen Pre6/ α 4 inkubiert. Im Lysat der Wildtyp-Zellen ist deutlich mehr prozessiertes m-Pre2/ β 5 als unprozessiertes pro-Pre2/ β 5 detektierbar, während dieses Verhältnis beim Lysat der *Δ ump1*-Zellen nahezu umgekehrt ist. Das Lysat aus *Δ ump1*-Zellen weist zudem eine intermediäre i-Pre2/ β 5-Form auf, die schon von Ramos *et al.* beschrieben wurde (Ramos *et al.*, 1998). Im Lysat der *Δ blm3*-Zellen liegt deutlich weniger pro-Pre2/ β 5 als im Lysat aus Wildtyp-Zellen vor. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Abwesenheit von Blm3 zu einer Veränderung des molaren Verhältnisses von proteasomalen Vorläuferkomplexen zu maturierten Proteasomen in der Zelle führt: Während *Δ ump1*-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nichtprozessiertes pro-Pre2/ β 5 anreichern, liegt in *Δ blm3*-Zellen deutlich weniger pro-Pre2/ β 5 als in Wildtyp-Zellen vor. Durch das nachfolgend beschriebene Pulse Chase-Experiment zur Prozessierung von Pre2/ β 5 und zur Degradation von Ump1 soll die Kinetik der proteasomalen Maturierung in Wildtyp-Zellen mit der von *Δ blm3*-Zellen verglichen werden.

5.18.2 Kinetik der proteasomalen Maturierung

Die Kinetik der proteasomalen Maturierung lässt sich durch Pulse Chase-Experimente über die Maturierung der aktiven Untereinheiten bzw. die Degradation des proteasomalen Maturierungsfaktors Ump1 verfolgen. Dazu werden die Proteine zunächst *in vivo* mit ^{35}S -Methionin/Cystein radioaktiv markiert, bevor durch Umsetzen der Zellen in Chase-Medium, das nicht-radioaktives Methionin enthält, der Chase initiiert wird. Zu bestimmten Zeitpunkten werden Zellen entnommen, und nach dem Zellaufschluss werden die markierten Proteine, hier Pre2/ β 5 bzw. Ump1, immunpräzipitiert. Im Anschluss an eine SDS-PAGE erfolgt die Detektion der radioaktiven Proteinbanden mithilfe eines Phosphorfluoro-Imagers. In Wildtyp-Zellen wird ein Großteil der Propeptid-enthaltenden β -Untereinheiten Pup1/ β 2 und Pre2/ β 5 innerhalb von 30 Minuten maturiert, und auch der größte Teil des Maturierungsfaktors Ump1 wird innerhalb dieser Zeit degradiert (Ramos *et al.*, 1998). Die Prozessierung von pro-Pre2/ β 5 ist ein entscheidender Schritt in der Maturierung des Proteasoms, da sie direkt an die Bildung von 20S-Proteasomen aus zwei Halbproteasomen-Vorläuferkomplexen gekoppelt ist. Zur Ausbildung des aktiven Zentrums, das für die autokatalytische Prozessierung von pro-Pre2/ β 5 benötigt wird, müssen zwei Halbproteasomen so zueinander orientiert sein, dass pro-Pre2/ β 5 des einen

Halbproteasoms und Pre1/ β 4 eines zweiten Halbproteasoms nebeneinander positioniert sind (Heinemeyer, 2000). Um die Beteiligung von Blm3 an einem späten Schritt der Assemblierung bzw. an der Maturierung des Proteasom zu untersuchen, wurden Pulse Chase-Experimente durchgeführt, in denen die Maturierung der HA-markierten β -Untereinheit Pre2/ β 5 bzw. die Degradation des HA-markierten proteasomalen Maturierungsfaktors Ump1 verfolgt wurde (Abb. 43).

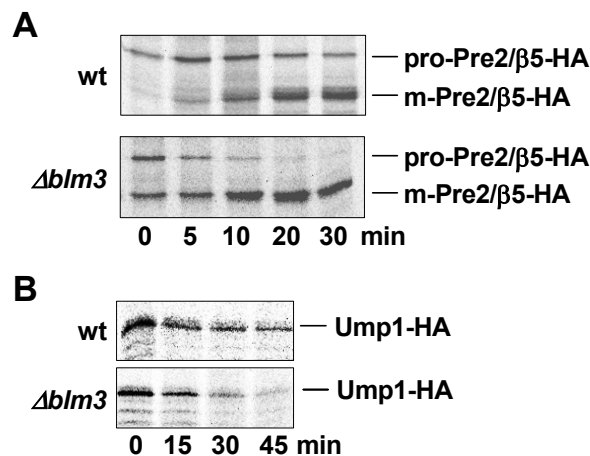


Abb. 43: Die Kinetik der proteasomalen Maturierung ist $\Delta blm3$ -Zellen beschleunigt

Die Kinetik der proteasomalen Maturierung wurde anhand der Prozessierung der β -Untereinheit Pre2/ β 5 und der Degradation des proteasomalen Maturierungsfaktors Ump1 mithilfe eines Pulse Chase verfolgt. Nach 5min Markieren mit ^{35}S -Methionin/Cystein wurde der Chase durch Umsetzen der Zellen in nicht-radioaktives, Methionin-haltiges Medium initiiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Nach dem Zellaufschluss wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Banden mithilfe eines Phospho-Imagers detektiert. **A** Kinetik der autokatalytischen Prozessierung der β -Untereinheit Pre2/ β 5. **B** Kinetik der autokatalytischen Prozessierung des Maturierungsfaktors Ump1.

Die Pulse Chase-Experimente zur Ermittlung der Kinetik der proteasomalen Maturierung in Wildtyp und $\Delta blm3$ -Deletionsmutante lassen erkennen, dass sowohl die Prozessierung von Pre2/ β 5 als auch die Degradation von Ump1 im $\Delta blm3$ -Deletionsstamm deutlich schneller ablaufen als im Wildtyp.

5.19 Lokalisation von Blm3-GFP-HA in *Δump1*

Ump1-assoziierte 13-16S-Vorläuferkomplexe des Proteasoms werden mithilfe von Importin α /Importin β in den Zellkern transportiert, wo die Assemblierung und Maturierung zu reifen 20S-Komplexen stattfindet (Lehmann *et al.*, 2002). Wie mithilfe einer GFP-Markierung fluoreszenzmikroskopisch und durch Zellfraktionierung gezeigt werden konnte, ist Blm3 in Wildtyp-Zellen im Zellkern lokalisiert (Abb. 33). Da Blm3 an Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexen gebunden vorliegt, stellte sich die Frage, ob Blm3 durch die direkte Bindung an den Maturierungsfaktor Ump1 zusammen mit dem Proteasomen-Vorläuferkomplex in den Zellkern transportiert wird. In diesem Falle sollte Blm3-GFP-HA in der *Δump1*-Deletionsmutante nicht im Zellkern zu detektieren sein. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung eines *Δump1*-Deletionsstamms, der GFP- und HA-markiertes Blm3 enthält, zeigt die nukleäre Lokalisation von Blm3-GFP-HA (Abb. 44).

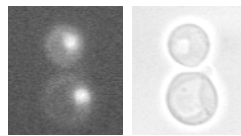


Abb. 44: GFP-markiertes Blm3 ist in *Δump1*-Zellen nukleär

Fluoreszenzmikroskopische Detektion der GFP-Fluoreszenz von GFP- und HA-markiertem Blm3 in *Δump1*-Zellen.

Daraus lässt sich schließen, dass der Import von Blm3 in den Zellkern unabhängig von Ump1 erfolgt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass Blm3 unabhängig von Ump1 an den proteasomalen Vorläuferkomplex gebunden und mit diesem in den Zellkern transportiert wird. Da Blm3 eine potentielle NLS (nuclear localization signal)-Sequenz enthält, ist auch ein unabhängiger Kerntransport von proteasomalen Vorläuferkomplexen und Blm3 denkbar.

5.20 Doppeldeletion *Δblm3Δump1*

Der Maturierungsfaktor Ump1 ist an proteasomale Vorläuferkomplexe assoziiert und wird nach der Dimerisierung der Halbproteasomen im Inneren des Proteasoms degradiert (Ramos *et al.*, 1998). Das Protein Blm3 ist an das naszierende Proteasom, nicht aber an das Halbproteasom assoziiert (Abb. 41). Hieraus lässt sich schließen, dass

Blm3 an einem späteren Schritt der proteasomalen Maturierung beteiligt ist als Ump1. $\Delta ump1$ -Zellen sind stark temperatursensitiv (Ramos *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Vermutung war zu erwarten, dass eine $\Delta ump1 \Delta blm3$ -Doppeldeletionsmutante den Phänotyp der $\Delta ump1$ -Mutante, also eine starke Temperatursensitivität, zeigen sollte. Tatsächlich verhalten sich $\Delta ump1 \Delta blm3$ -Zellen wie $\Delta ump1$ -Zellen stark temperatursensitiv (Abb. 45).

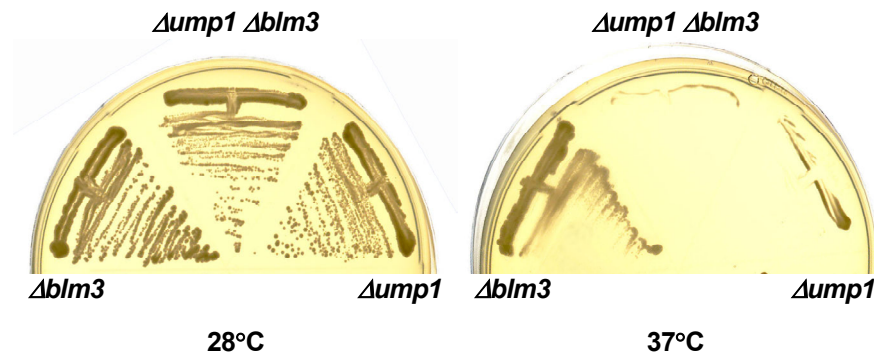


Abb. 45: $\Delta blm3 \Delta ump1$ -Zellen sind wie $\Delta ump1$ -Zellen stark temperatursensitiv

$\Delta blm3$ -, $\Delta blm3 \Delta ump1$ - und $\Delta ump1$ -Zellen wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und bei 28°C bzw. 37°C inkubiert.

5.21 Überexpression von Blm3

Nachdem das Protein Blm3 die proteasomale Assemblierung bzw. Maturierung in einem späten Schritt verzögert, sollte untersucht werden, ob es möglich ist, durch Überexpression von Blm3 Ump1-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe zu stabilisieren. Um Blm3-assoziierte proteasomale Vorläuferkomplexe affinitätschromatographisch isolieren zu können, wurde für diesen Versuch ein Stamm hergestellt, der Protein A-markiertes und mit dem Galaktose1-Promotor versehenes Blm3 anstelle des endogenen Proteins exprimiert (Abb. 46).

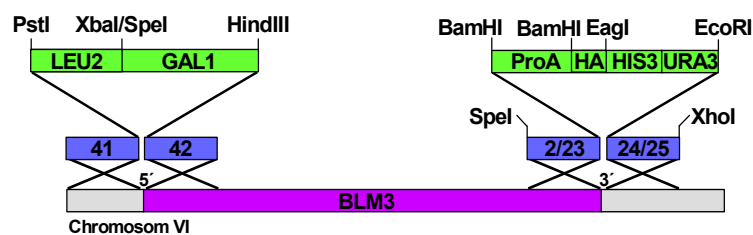


Abb. 46: Skizze zur Herstellung der Stämme *BLM3-ProA* und *GAL1-BLM3-ProA*

Durch homologe Rekombination wurden mithilfe der Primer 2 und 23 sowie 24 und 25 eine Protein A-Markierung und eine HA-Markierung zusammen mit den Auxotrophiemarkern *HIS3* und *URA3* in den 3'-Bereich des Gens *BLM3* eingeführt. Der endogene Promotor wurde durch homologe Rekombination mithilfe der Primer 41 und 42 durch den *GAL1*-Promotor ersetzt. Für die ProA-HA-Markierung strangabwärts von *BLM3* wurden die PCR-Fragmente 2/23 (Primer 2 und 23) und 24/25 (Primer 24 und 25) hergestellt und in dem Vektor pSL1190 mit den Genen ProA, HA sowie den Auxotrophiemarkern *HIS3* und *URA3* zusammengesetzt. Das Integrationskonstrukt wurde mit *SpeI* und *XhoI* ausgeschnitten und über die zum 3'-Ende (2/23) bzw. zum Bereich strangabwärts des 3'-Endes von *BLM3* (24/25) homologen Bereiche von jeweils etwa 60bp Länge durch homologe Rekombination in den Wildtyp-Stamm *WCGa* integriert. Zur Herstellung des *GAL1*-Promotorkonstrukts wurde das Gen *GAL1* mit *HindIII* und *SpeI* aus pYES2 und das *LEU2*-Gen mit *XbaI* und *PstI* aus pJJ250 ausgeschnitten. Nach dem Zusammensetzen beider Gene in dem Vektor pKS+ wurde mithilfe der Primer 40 und 41 durch PCR ein Integrationskonstrukt hergestellt, das nach Amplifizierung in dem Vektor pCR2.1 und Ausschneiden mit *PstI* und *HindIII* in Hefe transformiert wurde.

Die Überexpression wurde durch Umsetzen in bzw. Aufbringen auf galaktosehaltiges Medium induziert. Während Zellen, die Protein A-markiertes Blm3 anstelle des endogenen Proteins exprimieren, auf glukosehaltigem Medium ein nur leicht vermindertes Wachstum zeigen, führt die Überexpression von Protein A-markiertem Blm3 zum Zelltod (Abb. 47).

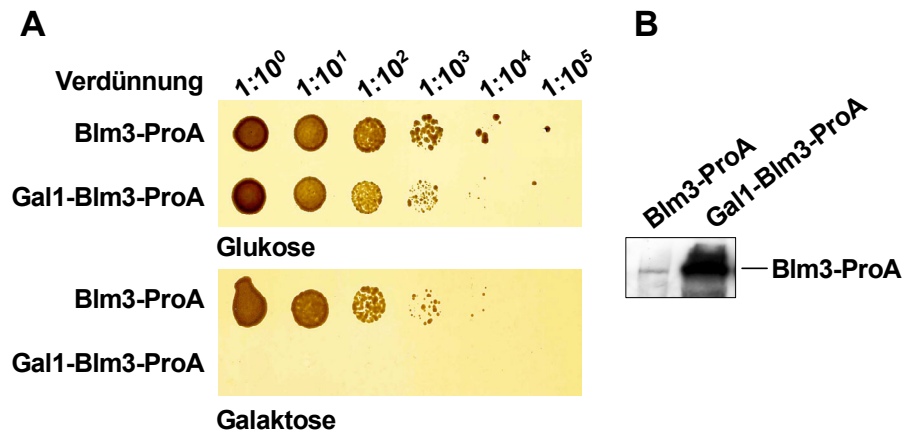


Abb. 47: Die Überexpression von Blm3-ProA ist letal

A Stationäre Kulturen von Zellen, die Protein A-markiertes Blm3 hinter dem endogenen (Blm3-ProA) bzw. dem Galaktose1-Promotor (Gal1-Blm3-ProA) exprimierten, wurden wiederholt im Verhältnis 1:10 verdünnt, auf CM-Platten, die Glukose bzw. Galaktose enthielten, aufgetropft und bei 28°C inkubiert. **B** Western Blot-Analyse von Proteinproben aus Zellen, die Protein A-markiertes Blm3 hinter dem endogenen (Blm3-ProA) Promotor bzw. dem Galaktose1-Promotor (Gal1-Blm3-ProA) exprimierten. Der Zellaufschluss erfolgte nach 3h Induktion mit Galaktose. Der Blot wurde mit HA-Antikörpern inkubiert.

In einem nachfolgenden Versuch wurde getestet, ob sich auch die Überexpression von nicht-markiertem Blm3 letal verhält. Dazu wurden Zellen untersucht, in denen der endogene Promotor von Blm3 durch homologe Rekombination gegen den Galaktose1-Promotor ausgetauscht wurde (vgl. Abb. 46). Das Ausstreichen der Zellen auf glukose- bzw. galaktosehaltiges Medium zeigt, dass auch die Überexpression des nicht-markierten hochmolekularen Proteins Blm3 zu einem deutlichen Wachstumsdefekt führt (Abb. 48). Eine Anreicherung der unprozessierten katalytisch aktiven β -Untereinheit pro-Pre2/ β 5 konnte nicht beobachtet werden, woraus geschlossen werden kann, dass die Überexpression von Blm3 nicht zu einer Stabilisierung von proteasomalen Vorläuferkomplexen führt. Dies würde bedeuten, dass Blm3 nicht limitierend für einen späten Schritt der proteasomalen Assemblierung oder Maturierung wäre.

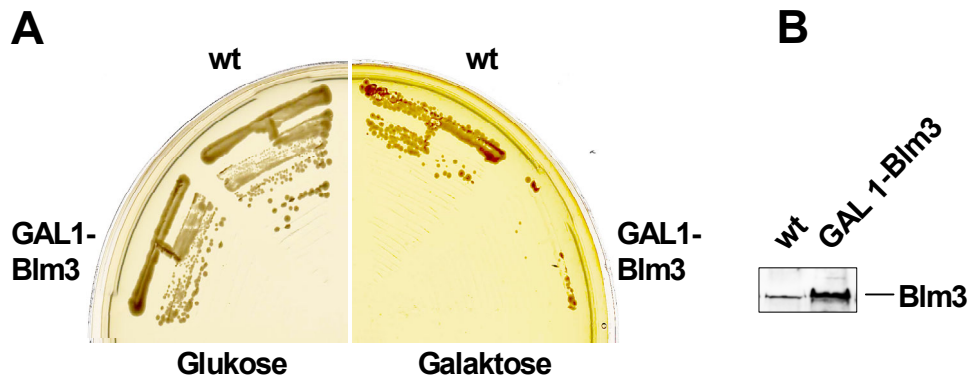


Abb. 48: Die Überexpression von Blm3 ist toxisch

A Wildtyp-Zellen und Zellen, die Blm3 unter der Kontrolle des Galaktose1-Promotors anstelle des endogenen Promotors exprimierten, wurden auf glukose- bzw. galaktosehaltige CM-Platten ausgestrichen und bei 28°C inkubiert. **B** Western Blot-Analyse von Proteinproben aus Wildtyp-Zellen und aus Zellen, die Blm3 unter der Kontrolle des Galaktose1-Promotors (Gal1-Blm3) exprimierten. Der Zellaufschluss erfolgte nach 3h Induktion mit Galaktose. Der Blot wurde mit Antikörpern gegen Blm3 inkubiert.

Wegen der Toxizität der Überexpression des hochmolekularen Proteins Blm3 ist allerdings davon auszugehen, dass die Zellen sich unter diesen Bedingungen in einem unphysiologischen Zustand befinden.

6 DISKUSSION

6.1 Blm3 und PA200 als Regulatoren der proteasomalen Aktivität

PA200 (Proteasomal Activator, 200kDa) ist mit nur 17% Identität vermutlich das humane Homologe zu Blm3. Ustrell *et al.* konnten zeigen, dass das nukleäre Protein PA200 mit Proteasomen assoziiert ist und die Degradation fluorogener Peptidsubstrate um einen Faktor von zwei bis zehn aktiviert (Ustrell *et al.*, 2002). Eine Aktivierung der Degradation von Proteinsubstraten konnte nicht nachgewiesen werden. Die von Ustrell *et al.* in Nativgelen beobachtete erhöhte Aktivität von mit PA200 assoziierten Proteasomen gegenüber „freien“ 20S-Proteasomen steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen ihrer *in vitro*-Aktivitätstests, wonach PA200 als Proteasomen-Aktivator wirkt (Ustrell *et al.*, 2002).

Zunächst wurde ein *in situ*-Aktivitätstest mit einem chromogenen Peptidsubstrat durchgeführt, durch den keine Unterschiede hinsichtlich der proteasomalen Aktivität zwischen Wildtyp- und *Δblm3*-Zellen festgestellt werden konnten. Analog zu den von Ustrell *et al.* durchgeführten Versuchen wurden anschließend für das Protein Blm3 *in vitro*-Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten durchgeführt. Bei einem molaren Überschuss von Blm3 zum 20S-Proteasom konnte eine Inhibition der proteasomalen Aktivität durch das Protein Blm3 gezeigt werden (Kap. 5.6.3). Die Tatsache, dass eine inhibitorische Wirkung von Blm3 erst bei Überschuss von Blm3 zu beobachten ist, könnte darauf hindeuten, dass für eine Wirkung von Blm3 auf die proteasomale Aktivität weitere Faktoren benötigt werden, die mithilfe der durchgeführten *in vitro*-Tests möglicherweise nicht erfasst wurden.

In Übereinstimmung mit den *in situ*- und *in vivo*-Aktivitätstests konnte für das Protein Blm3 auch in Nativgelen keine Proteasomen-aktivierende Wirkung nachgewiesen werden (Kap. 5.14). Zur weiteren Klärung der Frage, ob es sich bei dem Protein Blm3 um ein Proteasomen-aktivierendes Protein handelt, wurden *in vivo*-Aktivitätstests mit einem *Δblm3*-Deletionsstamm durchgeführt (Kap. 5.6.1 und 5.7). Die *in vivo*-Degradation des cytosolischen Substratproteins FBPase ist in *Δblm3*-Zellen gegenüber Wildtyp-Zellen geringfügig beschleunigt (Kap. 5.7.1). Die ERAD-Substrate CPY* und CTG*, deren Degradation wegen einer möglichen Adapterfunktion von Blm3 im ERAD-Mechanismus untersucht wurden, werden in *Δblm3*-Zellen dagegen mit einer

vergleichbaren Kinetik wie in Wildtyp-Zellen degradiert (Kap. 5.7.2). Insgesamt deuten die vorliegenden Ergebnisse der verschiedenen Aktivitätstests auf eine schwache Inhibition der proteasomalen Aktivität durch Blm3 hin. Die nur geringe inhibitorische Wirkung lässt darauf schließen,

- dass Blm3 entweder spezifisch die Degradation bestimmter Substrate, z. B. an bestimmten Substrukturen des Kerns, inhibiert,
- dass Blm3 die Aktivität des Proteasoms nur unter ganz bestimmten zellulären Bedingungen beeinflusst, oder
- dass sich der Einfluss von Blm3 auf eine spezifische Proteasomen-Subpopulation beschränkt.

Mit Hinblick auf die später gefundenen Ergebnisse, denen zufolge Blm3 an proteasomale Vorläuferkomplexe gebunden vorliegt und die Maturierung zu 20S-Proteasomen verzögert, erscheinen die letzten beiden der oben genannten Möglichkeiten wahrscheinlich (Kap. 5.15, Kap. 5.18). Die geringe inhibitorische Wirkung von Blm3 steht in deutlichem Gegensatz zur Proteasomen-aktivierenden Wirkung des humanen Homologen PA200 (Ustrell *et al.*, 2002). Allerdings ist auch der aktivierende Effekt von PA200 auf die *in vitro*-Degradation von Peptidsubstraten mit einem Faktor von 2-10 als eher gering anzusehen. So aktiviert z. B. der Aktivator PA28 α/β das Proteasom mit einem Faktor von 10-20 (Dubiel *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1992). Für die Degradation von Substratproteinen konnte für PA200 nahezu kein Effekt nachgewiesen werden (Ustrell *et al.*, 2002). Angesichts der Unterschiede zwischen den Ergebnissen für Blm3 und PA200 bleibt die Frage, ob es sich bei diesen Sequenzhomologen tatsächlich um funktionelle Homologe handelt.

Das Ergebnis, dass in *Abm3*-Zellen *in vivo* die Degradation der cytosolischen FBPase (Fructose-1,6-bisphosphatase) leicht beschleunigt, der Abbau der ERAD-Substrate CPY* und CTG* dagegen unverändert ist, lässt sich mit Hinblick auf die weiteren Ergebnisse möglicherweise wie folgt erklären: In *Abm3*-Zellen ist die Maturierung der Proteasomen beschleunigt. Die Lebensdauer der mengenmässig geringen Fraktion latenter oder naszierender Proteasomen ist drastisch verkürzt, so dass die vorliegende Menge an reifen Proteasomen etwas erhöht ist. Dies äußert sich möglicherweise in der leicht beschleunigten Degradation der cytosolischen FBPase. Substrate der ER-assoziierten Degradation (ERAD) werden durch das Sec61-Translokon aus dem

endoplasmatischen Reticulum (ER) in das Cytoplasma transloziert, dabei ubiquitiniert und anschließend degradiert (Plemper und Wolf, 1999). Es wird vermutet, dass Adapterproteine existieren, über die das Proteasom in der Nähe des Sec61-Translokons assoziiert ist (Kap. 2.4.2.1; Kostova und Wolf, 2003). Wenn in *Abm3*-Zellen die vorliegende Menge reifer Proteasomen geringfügig erhöht ist, dann ist daher denkbar, dass sich dies auf die Mechanismen der cytosolischen Degradation und der ER-assoziierten Degradation unterschiedlich auswirkt. Aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen sind für die Kinetik der ER-assoziierten Degradation möglicherweise andere Faktoren geschwindigkeitsbestimmend als für die cytosolische Degradation der FBPase, was die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Degradation von FBPase und CPY* bzw. CTG* erklären könnte.

6.2 Blm3 und DNA-Reparatur

Die Punktmutante *blm3-1* wurde aufgrund ihrer Hypersensitivität gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin identifiziert (Kap. 2.5; Moore, 1991). Später wurde auch die Bleomycin-Hypersensitivität einer *Abm3*-Deletionsmutante beschrieben (Evans Febres *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass das Protein Blm3 entweder an der Internalisierung und Detoxifizierung von Bleomycin oder an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sein könnte (Evans Febres *et al.*, 2001). Da Bleomycin neben der Schädigung der DNA in *S. cerevisiae* auch Läsionen der Plasmamembran hervorruft, ist die Grundlage dieser Vermutung fraglich (Beaudouin *et al.*, 1993; Moore, 1999). Unterstützt wird sie allerdings durch die Identifizierung eines Komplexes, der sowohl Blm3 als auch Sir2, Sir3 und Sir4 enthält (Ho *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass ein Komplex aus Sir2, Sir3 und Sir4 an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch einen als „Non Homologous End Joining“ bezeichneten Mechanismus (NHEJ) beteiligt ist (Kap. 2.4.3; Lewis und Resnick, 2000; Gasser und Cockell, 2001; Gartenberg, 2000). Auch für PA200 wird wegen seiner Homologie zu Blm3 eine Beteiligung an der DNA-Reparatur vermutet. Tatsächlich bildet PA200 nach Einwirkung ionisierender Strahlung auf HeLa-Zellen diskrete intranukleäre Ansammlungen (Ustrell *et al.*, 2002). Eine solche Änderung der intranukleären Lokalisation nach DNA-Schädigung ist von Faktoren wie Rad52 und 53BPI bekannt, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Lisby *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bleomycin-Hypersensitivität von *Δblm3*-Zellen nicht verifiziert werden (Kap. 5.5.1). Auch anderen Forschungsgruppen gelang es nicht, die Bleomycin-Hypersensitivität der *Δblm3*-Mutante zu bestätigen (C. W. Moore, pers. Mitteilung). Interessanterweise zeigen auch die Deletionsmutanten *sir2*, *sir3* und *sir4* keine Bleomycin-Hypersensitivität, obwohl Sir2, Sir3 und Sir4 an der DNA-Reparatur durch NHEJ beteiligt sind (Lewis und Resnick, 2000; Gasser und Cockell, 2001). In Übereinstimmung hiermit steht, dass durch Bleomycin verursachte DNA-Schäden nicht durch NHEJ, sondern durch Homologe Rekombination und durch Postreplication Repair behoben werden (Keszenman *et al.*, 1992).

Auch wenn die Proteomik Hinweise darauf liefert, lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht auf eine Beteiligung von Blm3 an der DNA-Reparatur schließen. Die Bleomycin-Hypersensitivität der proteasomalen Mutanten *pre1-1 pre2-2* und *cim5-1* weist allerdings auf eine generelle Beteiligung des proteasomalen Systems an der DNA-Reparatur hin (*PRE1* = β4, *PRE2* = β5, *CIM5* = *RPT1*; vgl. Anhang 1). Da dem Proteasom eine zentrale Rolle für die Degradation regulatorischer Proteine zukommt, ist seine Mitwirkung an DNA-Reparaturmechanismen, für die es schon zahlreiche Hinweise gibt, nicht unwahrscheinlich (Podlaska *et al.*, 2003). Publizierten Ergebnissen zufolge sind verschiedene Proteine sowohl der DNA-Reparatur als auch am Ubiquitin-Proteasom-System beteiligt: Rad23, das an der Nucleotide Excision Repair (NER) beteiligt ist, besitzt eine Ubl-Domäne und interagiert sowohl mit dem 26S-Proteasom als auch mit dem für die DNA-Reparatur benötigten Protein Rad4 (Schauber *et al.*, 1998). Dieses wiederum wird vermutlich vom 26S-Proteasom degradiert (Lommel *et al.*, 2000). Rad6 ist als Ubiquitin-konjugierendes Enzym an der DNA Postreplication Repair (PRR) beteiligt (Broomfield *et al.*, 2001). Der proteasomale Maturierungsfaktor Ump1 wird, wie auch die katalytisch aktiven Untereinheiten β2/Pup1 und β5/Pre2, mit dem Mechanismus der Post-replication DNA Repair (PRR) in Verbindung gebracht (Podlaska *et al.*, 2003).

In den hier vorgestellten Ergebnissen verhält sich die Mutante *cim3-1* im Gegensatz zu den proteasomalen Mutanten *pre1-1 pre2-2* und *cim5-1* gegenüber Bleomycin und Zeocin resistenter als der Wildtyp (*CIM3* = *RPT6*). *Cim3-1* besitzt eine Punktmutation in der 19S-ATPase-Untereinheit Rpt6. Die verminderte Bleomycinsensitivität der *cim3-1*-Mutante steht mit publizierten Ergebnissen in Einklang, nach denen Mutationen in den ATPasen Rpt4 und Rpt6 des 19S-Komplexes die Sensitivität gegenüber UV-

Strahlung teilweise unterdrücken und die in der *Δrad23*-Deletionsmutante defekte Nucleotide Excision Repair (NER) wiederherstellen (Gillette *et al.*, 2001). Dies spricht für eine von Rad23 unabhängige Wechselwirkung zwischen Proteasom und NER. Mutationen in Rpt4 und Rpt6 unterdrücken den NER-Defekt, der in Mutanten auftritt, in denen die Ubl-Domäne von Rad23 deletiert ist (Gillette *et al.*, 2001). Dies spricht dafür, dass die Ubl-Domäne von Rad23 den Einfluss des 19S-Komplexes auf die NER moduliert. Da sich die *cim5-1*-Mutante im Gegensatz zur *cim3-1*-Mutante Bleomycinhypersensitiv verhält, lässt sich schlussfolgern, dass für die modulierende Wechselwirkung zwischen 19S und Rad23 nur bestimmte 19S ATPase-Untereinheiten verantwortlich sind, zu denen Cim5/Rpt1 nicht gehört. Eine Korrelation zwischen defekter proteasomaler Proteolyse und NER wurde bisher nicht beobachtet. Dies führte zu der Annahme, dass nicht die proteasomale Proteolyse, sondern eine Chaperone-artige Aktivität des 19S-Regulators oder eine durch ihn assistierte Umformung von Proteinkomplexen die Geschwindigkeit oder die Effizienz der NER reguliert (Gillette *et al.*, 2001). Aus *E. coli* ist bekannt, dass der Protease-Aktivatorkomplex ClpX, der ebenfalls zur Familie der AAA-ATPasen gehört, sowohl eine regulatorische Rolle in der Proteolyse als auch eine nicht-proteolytische Rolle in der Zerlegung eines Protein-DNA-Komplexes während der Lysogenie des Bakteriophagen Mu spielt (Mhammedi-Alaoui *et al.*, 1994). Die Bleomycin-Hypersensitivität der *pre1-1 pre2-2*-Mutante lässt allerdings darauf schließen, dass nicht nur der 19S-Regulator, sondern auch der 20S-Komplex an DNA-Reparatur-Mechanismen beteiligt ist.

Zur Klärung der Frage, inwieweit Blm3 an Mechanismen der DNA-Reparatur beteiligt sein könnte, wäre zunächst eine genauere Charakterisierung des Komplexes aus Blm3 und Sir2/Sir3/Sir4 und die Eingrenzung eines infrage kommenden Mechanismus hilfreich. Dies könnte z. B. durch Silencing Assays in der *Δblm3*-Deletionsmutante untersucht werden.

6.3 Lokalisation von Blm3

Wie sowohl mithilfe einer GFP-Markierung *in vivo* als auch durch biochemische Fraktionierung gezeigt werden konnte, ist Blm3 im Zellkern lokalisiert (Kap. 5.11). Damit stimmt die Lokalisation von Blm3 mit der Lokalisation der Mehrzahl proteasomaler Komplexe in Hefe überein (Kap. 2.3.4; Enenkel *et al.*, 1998). Kürzlich wurde im Rahmen einer Untersuchung der Lokalisation von 75% des Hefe-Proteoms

die Kernlokalisierung von Blm3 bestätigt (Huh *et al.*, 2003). Die Lokalisation von Blm3 ist unabhängig vom proteasomalen Maturierungsfaktor Ump1 (Kap. 5.19). Proteasomale Komplexe und Vorläuferkomplexe zeigen in *Abm3*-Deletionszellen keine Delokalisation (Kap. 5.8). Das Protein Blm3 wird daher nicht zur Adressierung des Proteasoms in den Zellkern benötigt. Die Frage, auf welchem Wege Blm3 in den Zellkern gelangt, ist noch ungeklärt. Obwohl die Lokalisation von Blm3 unabhängig von Ump1 ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Blm3 bereits im Cytoplasma an proteasomale Vorläuferkomplexe assoziiert und zusammen mit diesen mithilfe von Importin α /Importin β in den Zellkern transportiert wird. Gegen dieses Modell sprechen allerdings folgende Argumente:

- Blm3 besitzt in seinem N-terminalen Bereich eine NLS-Sequenz, die seinen unabhängigen Kernimport über die klassischen Importer Importin α /Importin β ermöglichen sollten.
- Da das zu Blm3 homologe Protein PA200 an die α -Ringe des Proteasoms bindet, kann vermutet werden, dass dies auch für Blm3 zutrifft (Ustrell *et al.*, 2002). Die proteasomalen α -Untereinheiten enthalten in ihren N-terminalen Bereichen NLS-Sequenzen, über die sie als Vorläuferkomplexe mithilfe von Importin α /Importin β in den Zellkern transportiert werden. Es ist davon auszugehen, dass die NLS-Sequenzen der α -Untereinheiten durch die Bindung des hochmolekularen Proteins Blm3 unzugänglich werden. Die Vorstellung, ein proteasomaler Vorläuferkomplex könnte mit sieben unzugänglichen NLS-Sequenzen über das gebundene Protein Blm3, das eine einzige NLS-Sequenz enthält, in den Zellkern transportiert werden, erscheint aus biologischer Sicht wenig sinnvoll. Dass proteasomale Komplexe auch in *Abm3*-Deletionszellen im Zellkern lokalisiert sind, unterstützt die Annahme von einem generell unabhängigen Kernimport von proteasomalen Vorläuferkomplexen und Blm3.
- Proteasomen werden als Vorläuferkomplexe in den Zellkern transportiert (Lehmann *et al.*, 2002). Obwohl Halbproteasomen oder fast vollständige Halbproteasomen den größten bzw. stabilsten und damit experimentell am besten zugänglichen Anteil proteasomaler Vorläuferkomplexe darstellen (Braun, 2002; Lehmann *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 1998), konnte an ihnen kein assoziiertes Blm3 nachgewiesen werden.

Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass Blm3 getrennt von proteasomalen Vorläuferkomplexen in den Zellkern transportiert wird. Dies geschieht vermutlich ebenfalls über die klassischen Importer Importin α /Importin β , was mithilfe der in Importin α defekten Punktmutante *spr1-49* nachzuweisen sein sollte. Der getrennte Import von proteasomalen Vorläuferkomplexen und Blm3 in den Zellkern könnte eine Regulationsmöglichkeit für die proteasomale Maturierung darstellen.

6.4 Assoziation von Blm3 an proteasomale Komplexe

Mithilfe von Glycerin-Dichtegradienten und durch die Charakterisierung proteasomaler Komplexe, die durch nicht-denaturierende Gel-Elektrophorese aufgetrennt wurden, konnte gezeigt werden, dass Blm3 an naszierende Proteasomen assoziiert ist (Kap. 5.12, Kap. 5.14, Kap. 5.17). An Halbproteasomen ist Blm3 dagegen nicht nachweisbar. Wenn Blm3 nicht an Halbproteasomen, sondern nur an naszierende Proteasomen assoziiert vorliegt, stellt sich die Frage, ob ein oder zwei Blm3 an ein naszierendes Proteasom binden. PA200, das humane Homologe zu Blm3, bindet an die α -Ringe des Proteasoms und konnte an 20S-Komplexen und vermutlich auch an 26S-Komplexen detektiert werden (Ustrell *et al.*, 2002). Es ist an dieser Stelle allerdings anzumerken, dass in der von Ustrell *et al.* gezeigten Fraktionierung PA200 nicht exakt mit den aktiven Proteasomenfraktionen komigriert, sondern in leichteren Fraktionen, die proteasomale Vorläuferkomplexe enthalten könnten, zu finden ist (Ustrell *et al.*, 2002). Daher ist auch eine Assoziation von PA200 an proteasomale Vorläuferkomplexe nicht auszuschließen. Da sich naszierende Proteasomen und maturierte 20S-Proteasomen nur in der Prozessierung der β -Untereinheiten sowie im Vorliegen des Maturierungsfaktors Ump1 unterscheiden, weisen sie in der nicht-denaturierenden Gel-Elektrophorese ein identisches Laufverhalten auf. Eine Aussage darüber, ob Blm3 noch an *de novo* synthetisierte 20S-Proteasomen bindet, ist daher erst möglich, wenn es gelingt, naszierendes und maturiertes Proteasom zu unterscheiden. Das substöchiometrische Vorliegen von Blm3 in Proteasomen-Präparationen und seine Komigration mit Ump1-assoziierten Vorläuferkomplexen im Glycerin-Dichtegradienten legen allerdings den Schluss nahe, dass Blm3 überwiegend an Vorläuferkomplexe assoziiert vorliegt. Da Blm3 an einem späten Schritt der Maturierung beteiligt ist und dieser zu dem reifen 20S-Komplex führt, ist eine Assoziation von Blm3 an gerade maturierte 20S-Komplexe nicht unwahrscheinlich. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wodurch die

Ablösung von Blm3 vom maturierten 20S-Komplex erfolgt. Verschiedene Mechanismen sind denkbar:

- Das hochmolekulare Protein Blm3 könnte im Anschluss an die Maturierung durch das reife 20S-Proteasom degradiert werden, ähnlich wie der Maturierungsfaktor Ump1.
- Die Ablösung von Blm3 könnte durch das maturierte 20S-Proteasom selbst erfolgen, etwa durch eine Konformationsänderung.
- Blm3 könnte bei der Assemblierung von 26S-Proteasomen aus 20S-Komplexen und 19S-Komplexen durch den 19S-Regulatorkomplex abgelöst werden.

Vorläufige Cycloheximid Chase-Experimente zeigen keinerlei Anhaltspunkte für die proteasomale Degradation von Blm3 im Anschluss an die Maturierung. Ump1 und Blm3 unterscheiden sich wesentlich nicht nur in ihrer molaren Masse von 16 bzw. 240kDa, sondern auch in ihrer Assoziation an das Proteasom: Während Ump1 sich im Inneren des maturierten Proteasoms befindet, ist Blm3 wahrscheinlich außen an die α -Ringe des Proteasoms gebunden (Ramos *et al.*, 1998; Ustrell *et al.*, 2002). Die Degradation von Ump1 im Anschluss an die Maturierung ist daher naheliegend, während die Degradation von Blm3 einen erheblichen Aufwand darstellen würde und damit eher unwahrscheinlich erscheint. Zur Klärung dieser Frage könnte untersucht werden, ob in proteasomalen Mutanten, die einen Defekt in der Degradation zeigen, eine Stabilisierung von Blm3 vorliegt und ob sich diese Stabilisierung gegebenenfalls auf die Maturierung und Assemblierung des Proteasoms auswirkt.

Die Ablösung von Blm3 durch 19S-Regulatoren und die damit einhergehende kontrollierte „Übergabe“ des aktiven 20S-Komplexes an die Regulatorkomplexe wäre mit Hinblick auf die Regulation der Maturierung sinnvoll und gut denkbar. Kompetitionsversuche könnten Aufschluss darüber geben, ob das an proteasomale Komplexe gebundene Blm3 durch 19S-Komplexe abgelöst werden kann. Schwierig dürfte hierbei allerdings die Isolierung der kleinen Fraktion Blm3-gebundener Proteasomen und das Auffinden geeigneter *in vitro*-Bedingungen sein. Desweiteren stellt sich die Frage, ob an ein gerade maturiertes Proteasom ein oder zwei Blm3-Proteine assoziiert vorliegen, und ob es Proteasomen gibt, die ein assoziiertes Blm3 und einen 19S-Regulatorkomplex besitzen. Hier könnte die weitere Analyse proteasomaler Komplexe in nicht-denaturierenden Gelen sowie die elektronenmikroskopische Untersuchung Blm3-assoziierter Proteasomen Klarheit bringen.

6.5 In *Δblm3*-Zellen ist die Maturierung beschleunigt

Die Assemblierung von 20S-Proteasomen erfolgt aus proteasomalen Vorläuferkomplexen über Ump1-assoziierte Halbproteasomen (Kap. 2.3.3; Frentzel *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1998). Diese dimerisieren zu naszierenden Proteasomen, in denen die Prozessierung der katalytisch aktiven Untereinheiten und die Degradation von Ump1 erfolgt (Ramos *et al.*, 1998). Während Ramos *et al.* vermuten, dass es sich bei dem hauptsächlich vorliegenden Ump1-assoziierten Vorläuferkomplex um Halbproteasomen handelt, fand Braun, dass in diesem Komplex die Untereinheiten $\beta 6$ und $\beta 7$ noch nicht eingebaut sind (Ramos *et al.*, 1998; Braun, 2002). Obwohl gezeigt wurde, dass GFP-Strep-Markierungen an Pre6/ $\alpha 4$ und Ump1 die Funktionalität dieser Proteine nicht beeinträchtigen (Lehmann *et al.*, 2002; Enenkel *et al.*, 1999), kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie einen Einfluss auf die Kinetik der proteasomalen Maturierung haben. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass in den über Pre6/ $\alpha 4$ -GFP-Strep affinitätschromatographisch isolierten Proteasomenpräparationen Komplexe beobachtet wurden, die Ump1, aber ausschließlich maturiertes Pre2/ $\beta 5$ enthalten, obwohl Ump1 und pro-Pre2/ $\beta 5$ in nicht markierten Zellen mit vergleichbarer Kinetik degradiert bzw. prozessiert werden (Kap. 5.15; Ramos *et al.*, 1998). Ebenso ist nicht auszuschließen, dass die über die Ump1-GFP-Strep-Markierung affinitätschromatographisch isolierten proteasomalen Vorläuferkomplexe durch die Markierung stabilisiert werden. Eine Aussage über die Kinetik der proteasomalen Maturierung ist daher bei der Verwendung sterisch anspruchsvoller Markierungen wie der GFP-Strep-Markierung problematisch.

In Lysaten der *Δblm3*-Deletionsmutante ist das Verhältnis von prozessiertem zu unprozessiertem Pre2/ $\beta 5$ verglichen mit Wildtyp-Zellen zu der prozessierten β -Untereinheit hin verschoben (Kap. 5.18.1). Die kinetische Untersuchung zeigt, dass im *Δblm3*-Deletionsstamm die Prozessierung der Untereinheit Pre2/ $\beta 5$ und die Degradation des Maturierungsfaktors Ump1 beschleunigt sind (Kap. 5.18.2). Das Protein Blm3 wirkt daher verzögernd auf den Übergang vom naszierenden zum maturierten Proteasom, was in Übereinstimmung mit seiner Assoziation an naszierende Proteasomen steht (Abb. 49). Der Sinn einer Verzögerung dieses Vorgangs besteht vermutlich entweder in der Koordination oder in der Regulation der proteasomalen Assemblierung und Maturierung. Die Regulation der Maturierung könnte nötig sein, um ein unkontrolliertes Freisetzen eines proteolytisch aktiven 20S-Proteasoms zu verhindern, was wegen der Autoinhibition des 20S-Proteasoms durch die N-Termini der α -Untereinheiten

allerdings unwahrscheinlich ist (Groll *et al.*, 2000). Denkbar ist, dass Blm3 die bedarfsgerechte Bereitstellung *de novo* synthetisierter, latenter 20S-Proteasomen gewährleistet. Weiterhin könnte Blm3 in Abhängigkeit von bestimmten zellulären Signalen die Assemblierung und Maturierung des 20S-Proteasoms an bestimmten intrazellulären Strukturen oder Orten beeinflussen. Möglicherweise könnte hier eine Schnittstelle mit DNA-Reparaturmechanismen bestehen. Eine koordinierende Funktion von Blm3 könnte darin bestehen, den Übergang des naszierenden Proteasoms in das maturierte Proteasom mit der Assemblierung des 26S-Proteasoms aus 20S- und 19S-Komplexen zu verknüpfen. Ausgehend von den bisher vorliegenden Daten erscheint eine koordinierende Funktion des Proteins Blm3 in der proteasomalen Assemblierung und Maturierung naheliegend. Es stellt sich die Frage, ob Blm3 hierzu mit weiteren assistierenden Proteinen interagiert oder durch die Wechselwirkung mit weiteren Proteinen in seiner Wirkung beeinflusst wird. Die Untersuchung von weiteren Interaktionen des Proteins Blm3, z. B. durch Yeast Two Hybrid- und nachfolgende biochemische Experimente, könnte hierüber Aufschluss bringen.

Durch ein Yeast Two Hybrid-Experiment wurde das essentielle Protein Nob1 als mit der 19S-Untereinheit Rpn12 interagierendes Protein identifiziert (Tone *et al.*, 2000). Es wurde vermutet, dass Nob1 an der Assemblierung von 19S und 20S zu 26S-Proteasomen beteiligt ist und anschließend wie Ump1 durch das Proteasom degradiert wird (Tone und Toh-e, 2002). Durch Immunpräzipitation von Nob1 konnte keine Wechselwirkung mit Rpn12 detektiert werden, statt dessen wurde die Interaktion von Nob1 mit allen mutmaßlichen ribosomalen pre-40S-Komplexen gefunden (Fatica *et al.*, 2003). Übereinstimmend hiermit enthält Nob1 mutmaßliche Nuclease- und RNA-Bindungs-Domänen (Fatica *et al.*, 2003). Die Ko-Sedimentation von Nob1 mit 26S-Proteasomen im Saccharose-Gradienten konnte nicht reproduziert werden, statt dessen wurde in den fraglichen Fraktionen eine Kreuzreaktivität des anti-Nob1-Antikörpers beobachtet (Fatica *et al.*, 2003). Die Assoziation von Nob1 an das Proteasom ist daher als fraglich anzusehen und bedarf der Überprüfung. Sollte sich die Beteiligung von Nob1 an der Assemblierung von 26S-Proteasomen bestätigen, würde sich die Untersuchung einer möglichen Interaktion von Nob1 und Blm3 anbieten.

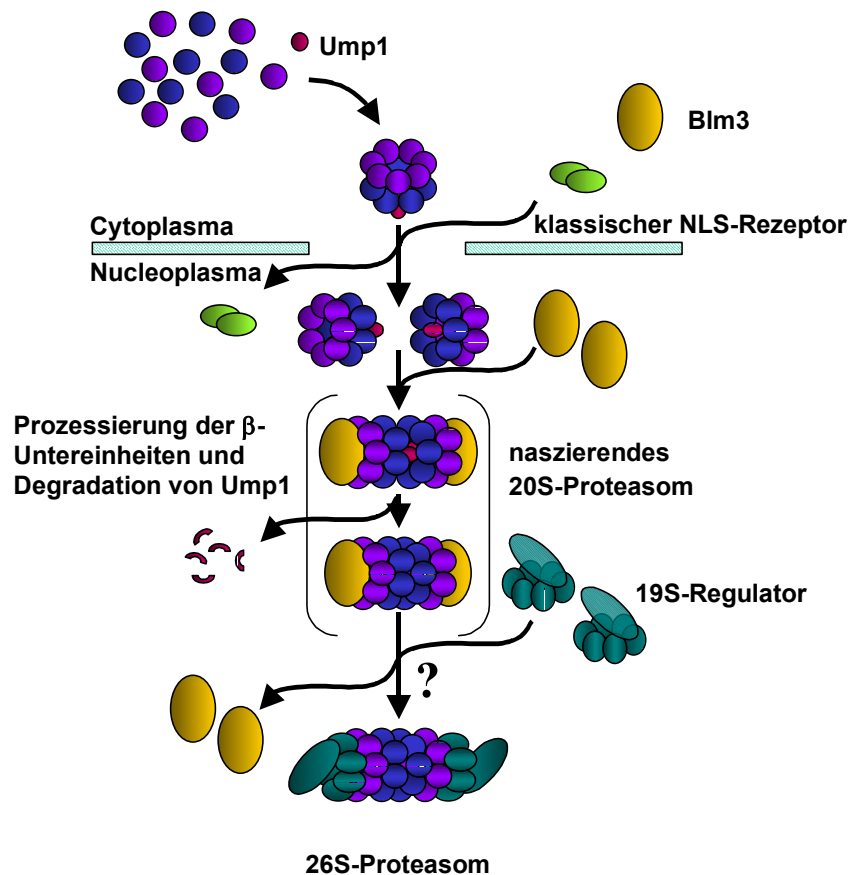


Abb. 49: Modell zur proteasomalen Maturierung

Die in einem frühen Schritt der proteasomalen Assemblierung im Cytosol gebildeten Vorläuferkomplexe, hier durch Halbproteasomen symbolisiert, werden über den klassischen Kernimportweg mithilfe von Importin α und Importin β importiert. Auch Blm3 wird vermutlich auf diesem Wege in den Kern transportiert. Im Kern dimerisieren die Halbproteasomen zu naszierenden Proteasomen. Blm3 assoziiert an die naszierenden Proteasomen. Nach der Prozessierung der β -Untereinheiten und der Degradation von Ump1 entsteht aus einem 20S-Komplex und zwei 19S-Komplexen der maturierte 26S-Komplex. Es bleibt zu klären, ob in diesem späten Schritt der proteasomalen Maturierung Blm3 durch die 19S-Regulatoren abgelöst wird.

6.6 Beeinflusst Blm3 das Verhältnis von 20S- zu 26S-Komplexen?

Die Funktion von Blm3 in einem späten Schritt der proteasomalen Maturation wirft die Frage auf, ob Blm3 das vorliegende Verhältnis von 20S- zu 26S-Komplexen beeinflusst. Tatsächlich gibt es erste Hinweise hierauf, die jedoch der Verifizierung bedürfen und daher in dieser Arbeit nicht dargestellt sind. Mit Ecm29 wurde ein nukleäres, an affinitätschromatographisch isolierte Proteasomen assoziiertes Protein identifiziert, das sowohl an das 20S-Proteasom als auch an den 19S-Regulator bindet und vermutlich die Stabilität des 26S-Proteasoms gewährleistet (Legget *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003). Es bleibt zu klären, ob eine Interaktion bzw. Konkurrenz zwischen Ecm29 und Blm3 besteht.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch kürzlich erschienene Veröffentlichungen, die sich mit Faktoren beschäftigen, die das Verhältnis von 20S- zu 26S-Komplexen beeinflussen: Bajorek *et al.* beschreiben, dass 26S-Komplexe in der stationären Wachstumsphase reversibel in 20S- und 19S-Komplexe zerfallen, möglicherweise, um die Proteolyse in dieser Phase zu unterbinden (Bajorek *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu früheren Daten, die eine Zunahme der Menge an 26S-Komplexen während der stationären Wachstumsphase zeigen (Fujimuro *et al.*, 1998b). Imai *et al.* berichten, dass es durch thermischen Stress zum reversiblen Zerfall von 26S-Komplexen in 20S- und 19S-Komplexe kommt (Imai *et al.*, 2003). Sowohl Imai *et al.* als auch Bajorek *et al.* zeigen die Reassemblierung von 19S- und 20S-Komplexen zu 26S-Komplexen mit Hilfe von nicht-denaturierenden Gelen. Interessanterweise beobachten beide Autoren hierbei das Erscheinen eines proteasomalen Komplexes, der in seinem Laufverhalten exakt dem in dieser Arbeit beschriebenen Blm3-assoziierten naszierenden Proteasom entspricht. Dieser wird von Imai *et al.* auf „unvollständig assemblierte Formen des 26S-Proteasoms“ zurückgeführt. Ausgehend von den hier vorgestellten Ergebnissen ist zu vermuten, dass es sich bei den von Bajorek *et al.* und Imai *et al.* beobachteten Komplexen um Blm3-assoziierte proteasomale Komplexe handelt. Für diese Beobachtung bieten sich zwei Erklärungen an:

- Bei der von Bajorek *et al.* und Imai *et al.* beobachteten Reassemblierung könnte es sich tatsächlich um eine *de novo*-Synthese von Proteasomen handeln, an der Blm3, wie in Kapitel 6.5 beschrieben, beteiligt ist.

- Es ist nicht auszuschließen, dass das Protein Blm3 generell zur Assemblierung von 20S-Proteasomen und 19S-Regulatoren oder zur Bereithaltung von 20S-Komplexen benötigt wird, ganz gleich ob es sich um *de novo* synthetisierte oder durch Zerfall freigesetzte 20S-Proteasomen handelt. Dies wäre ein Hinweis auf eine Funktion von Blm3 nicht nur in der Maturierung des 20S-Komplexes, sondern auch in der Assemblierung von 26S-Komplexen und würde bedeuten, dass Blm3 nicht nur an naszierende Proteasomen, sondern auch an bereits maturierte 20S-Proteasomen assoziieren kann. Da naszierende und maturierte Proteasomen im nicht-denaturierenden Gel ein gleiches Laufverhalten aufweisen, ist nicht zu erkennen, um welchen Komplex es sich bei Bajorek *et al.* und Imai *et al.* handelt.

Die Wiederholung der von Bajorek *et al.* und Imai *et al.* durchgeführten Reassemblierungsexperimente mit Proteasomenpräparationen aus der $\Delta blm3$ -Deletionsmutante könnte ebenso wie ein Immunoblot des Nativgels aus Wildtyp-Proteasomenpräparationen Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem fraglichen Komplex tatsächlich um einen mit Blm3 assoziierten Komplex handelt. Zur Klärung der Frage, ob es sich um einen aus zerfallenen 26S-Proteasomen oder aus neu synthetisierten Proteasomen entstandenen Komplex handelt, könnte die Reassemblierung von 20S- und 19S-Komplexen in Gegenwart von Cycloheximid durch nicht-denaturierende Gel-Elektrophorese untersucht werden. Die Gegenwart von Cycloheximid sollte, falls es sich um eine Neusynthese von Proteasomen handelt, zum Verlust der beobachteten Bande führen. Auf diese Weise sollte es möglich sein zu untersuchen, ob Blm3 auch an durch Zerfall entstandene proteasomale Komplexe bindet. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass das Protein Blm3 nicht nur, wie in dieser Arbeit gezeigt, an einem späten Schritt der proteasomalen Maturierung, sondern auch an der Assemblierung von 20S-Proteasomen und 19S-Regulatoren beteiligt ist.

Anhang 1: Nomenklatur proteasomaler Untereinheiten

Nomenklatur nach Baumeister <i>et al.</i> , 1998	„alte“ humane Nomenklatur	Andere Nomenklaturen	Gen-Name humaner Untereinheiten	Gen-Name <i>S. cerevisiae</i>
$\alpha 1$	Iota	Sc11 , Pros27, p27k, C7, Prs2, Y8, Prc2	PSMA6	PRS2
$\alpha 2$	C3	Pre8 , Prs4, Y7	PSMA2	PRS4
$\alpha 3$	C9	Pre9 , Prs5, Y13	PSMA4	PRS5
$\alpha 4$	C6-S/C6-L	Pre6 , XAPC-7	PSMA7	PRE6
$\alpha 5$	Zeta	Pup2 , Doa5	PSMA5	PUP2
$\alpha 6$	C2	Pre5 , nu, Pros30, p30k	PSMA1	PRE5
$\alpha 7$	C8	Pre10 , Prs1, C1, Prc1	PSMA3	PRS1
$\beta 1$	Y	Pre3 , delta, Lmp9	PSMB6	PRE3
$\beta 2$	Z	Pup1 , Lmp19, MC14,	PSMB7	PUP1
$\beta 3$	C10	Pup3 , theta	PSMB3	PUP3
$\beta 4$	C7	Pre1 , C11	PSMB2	PRE1
$\beta 5$	X	Pre2 , epsilon, Lmp17, MB1, Doa3, Prg1	PSMB5	PRE2
$\beta 6$	C5	Pre7 , gamma, Prs3, C5, Pts1	PSMB1	PRS3
$\beta 7$	N3	Pre4 , beta, Pros26	PSMB4	PRE4
Rpt1	S7	Ms1, Yta3, Cim5	PSMC2	CIM5
Rpt2	S4	Yhs4, Yta5, Mts2	PSMC1	YTA5
Rpt3	S6b	Tbp7, Yta2, Ynt1, MS73	PSMC4	YTA2
Rpt4	S10b	Sug2, Pcs1, Crl13, CADp44	PSMC6	SUG2
Rpt5	S6a	Tbp1, Yta1	PSMC3	YTA1
Rpt6	S8	Cim3 , Trip1, Sug1, Crl3, Tby1, Tbp10, m56	PSMC5	SUG1
Rpn1	S2	Trap2, Nas1, Hrd2, Rpd1, Mts4	PSMD2	HRD2
Rpn2	S1	Sen3	PSMD1	SEN3
Rpn3	S3	Sun2	PSMD3	SUN2
Rpn4		Son1, Ufd5		SON1
Rpn5		Nas5	PSMD12	YDL147W
Rpn6	S9	Nas4/6?	PSMD11	YDL097C
Rpn7	S10a	HUMORF07	PSMD6	
Rpn8	S12	Mov-34, Nas3	PSMD7	YOR261C
Rpn9	S11	Les1, Nas7	PSMD13	
Rpn10	S5a	ASF1, Sun1, Mcb1, Mbp1,	PSMD4	SUN1
Rpn11	S13	Poh1, Mpr1, Pad1	PSMD14	MPR1
Rpn12	S14, S5b, S15, P28	Nin1, Mts3	PSMD8, PSMD5, PSMD9, PSMD10	NIN1, NAS2

Literaturverzeichnis

- Aguilar, R.C., Wendland, B.** (2003) Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**: 184-190
- Anderson, L., Henderson, C., Adachi, Y.** (2001) Phosphorylation and rapid relocalization of 53 BPI to nuclear foci upon DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, **21** (5): 1719-1729
- Arendt, C.S., Hochstrasser, M.** (1999) Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *EMBO J.* **18** (13): 3575-3585
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** (1997), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M., Ciechanover, A.** (2000) Degradation of the epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J. Biol. Chem.* **275** (31): 23491-23499
- Bader G.D., Betel, C., Hogue, C.W.** (2003) BIND: The Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acids Res.* **31** (1): 248-50
- Bajorek, M., Finley, D., Glickman, M.H.** (2003) Proteasome Disassembly and Downregulation Is Correlated with Viability during Stationary Phase. *Curr. Biol.* **13**:1140-1144
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L., Pfeifer, F.** (1988) Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett.* **241** (1-2): 239-245.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E.** (1998) The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* **92**: 367-380
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A., Hampton, R.Y.** (2001) Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat. Cell Biol.* **3** (1): 24-29
- Bays, N.W., Hampton, R.Y.** (2002) Cdc48- Ufd1- Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr. Biol.* **12** (10): R366-R371
- Beaudouin, R., Lim, S. T., Steide, J. A., Powell, M., Mc.Koy, J. F., Pramanik, A., Johnson, E., Moore, C. W. and Lipke, P. N.** (1993), Bleomycin affects cell wall anchorage of yeast mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** (6): 1264-1269

- Berg, T.O., Fengsrud, M., Stromhang, B.E., Berg, T., Seglen, P.O.** (1998), Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes.. *J. Biol. Chem.* **273** (34): 21883-21892
- Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T.** (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278** (5344): 1806-1809
- Blanchard, F., Rusiniak, M.E., Sharma, K., Sun, X., Todorov, I., Mar Castellano, M., Gutierrez, C., Baumann, H., Burhans, W.C.** (2002) Targeted Destruction of DNA Replication Protein Cdc6 by Cell Death Pathways in Mammals and Yeast. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1536-1549
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., Huber, R.** (1999) The Proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**: 295-317
- Braun, B.** (2002) Funktionelle Charakterisierung des 19S regulatorischen Komplexes des 20S Proteasoms sowie Analyse der Biogenese des 20S Proteasoms. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Braun, B., Glickman, M.H., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.-M., Finley, D., Schmidt, M.** (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* **1**: 221-226
- Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., Jentsch, S.** (2002) Role of the ubiquitin-selective CDC48 (UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J.* **21** (4): 615-621
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goeckeler, J.L., Kruse, K.B., McCracken, A.A.** (1999) The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.* **274** (6): 3453-3460
- Broomfield, S., Hryciw, T., Xiao, W.** (2001) DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* **486**: 167-184
- Chapman, R., Sidrauski, C., Walter, P.** (1998) Intracellular signalling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**: 459-485
- Chen, P., Hochstrasser, M.** (1996) Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* **86** (6): 961-972
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L.** (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* **22**: 442-451
- Cox, J.S., Shamu, C.E., Walter, P.** (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**: 1197-1206

- Craiu A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Feneteany, G., Goldberg, A.L., Rock, K.L.** (1997) Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **272** (20): 13437-45
- Critchlow, S.E., Jackson, S.P.** (1998) DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 394-398
- Cromie, G.A., Connelly, J.C., Leach, D.R.F.** (2001) Recombination at Double-Strand Breaks and DNA Ends: Conserved Mechanisms from Phage to Humans. *Mol. Cell* **8**: 1163-1174
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M.** (1994) A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* **269** (10): 7059-7061
- Dick, T.P., Nussbaum, A., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stefanovic, S., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., Schild, H.** (1998) Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* **273** (40): 25637-25646
- Dohmen, J.** (2000) Primary Destruction Signals. In *Proteasomes*, eds. Wolf, D. H., Hilt, W.; Eurekah.com, Landes Bioscience Publishing Company, Georgetown, Texas, USA 2000
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., Rechsteiner, M.** (1992) Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.*, **267** (31): 22369-22377
- Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A.** (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286** (5446): 1882-1888
- Enenkel, C., Wolf, D.H.** (1993) BLH1 codes for a yeast thiol aminopeptidase, the equivalent of mammalian bleomycin hydrolase. *J. Biol. Chem.* **268** (10): 7036-7043
- Enenkel, C., Blobel, G., Rexach, M.** (1995) Identification of a Yeast Karyopherin Heterodimer That Targets Import Substrate to Mammalian Nuclear Pore Complexes. *J. Biol. Chem.* **270** (28): 16499-16502
- Enenkel, C., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M.** (1998) Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* **17** (21): 6144-6154
- Enenkel, C., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M.** (1999) GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol. Biol. Rep.* **26**: 131-135
- Erlich, H.A. et al.** (1989), PCR technology: principles and application for DNA amplification. Stockton Press

- Evans Febres, D., Pramanik, A., Caton, M., Doherty, K., Mc.Koy, J., Garcia, E., Alejo, W., Moore C.W.** (2001), The novel *BLM3* gene encodes a protein that protects against lethal effects of oxidative damage. *Cell. Mol. Biol.* **47** (7): 1149-1162
- Fatica, A., Oefflinger, M., Dlakić, M., Tollervey, D.** (2002) Nob1p Is Required for Cleavage of the 3' End of 18S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* **23** (5): 1798-1807
- Fehlker, M., Wendler, P., Lehmann, A., Enenkel, C.** (2003) Blm3 is part of nascent proteasomes and involved in a late step of nuclear proteasome maturation. *EMBO Rep.* **4** (10): 959-963
- Ferrel, K., Wilkinson, C.R.M., Dubiel, W., Gordon, C.** (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *TIBS* **25**: 83-88
- Ficarro, S B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., White, F.M.** (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. biotech.* **20**: 301-305
- Fitch, M.E., Cross, I.V., Turner, S.J., Adimoolam, S., Lin, C.X., Williams, K.G., Ford, J.M.** (2003) The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. *DNA Rep.* **2**: 819-826
- Förster, A., Whitby, F.G., Hill, C.P.** (2003) The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J.* **22** (17): 4356-4364
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., Kloetzel, P.-M.** (1994) 20S Proteasomes are Assembled *via* Distinct Precursor Complexes. Processing of LMP2 and LMP7 Proproteins Takes Place in 13-16S Preproteasome Complexes. *J. Mol. Biol.* **236**: 975-981
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W.** (1995) DNA repair and mutagenesis. *ASM Press*, Washington DC.
- Friedländer, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T.** (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**: 379-384
- Fröhlich, K.-U., Madeo, F.** (2000) Apoptosis in yeast: a monocellular organism exhibits altruistic behavior. *FEBS Lett.* **473** (1): 6-9
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H., Vierstra, R.D.** (2001) Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.* **20** (24): 7096-7107
- Fujimuro, M., Tanaka, K., Yokosawa, H., Toh-e, A.** (1998a) Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **423** (2): 149-154

- Fujimuro, M., Takada, H., Saeki, Y., Toh-e, A., Tanaka, K., Yokosawa, H.** (1998b) Growth-Dependent Change of the 26S Proteasome in Budding Yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**: 818-823
- Gartenberg, M.R.** (2000) The Sir proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: mediators of transcriptional silencing and much more. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 132-137
- Gasser, S.M., Cockell, M.M.** (2001) The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* **279**: 1-16
- Gaut, J.R., Hendershot, L.M.** (1993) The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 589-595
- Gavin, A.-C., Bösch, M., Krause, R. et al.** (2002), Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147
- Gerards, W.L., Enzlin, J., Häner, M., Hendriks, I.L.A.M., Aebi, U., Bloemendal, H., Boelens, W.** (1997) The Human α -Type Proteasomal Subunit HsC8 Forms a Double Ringlike Structure, but Does Not Assemble into Proteasome-like Particles with the β -Type Subunits HsDelta or HsBPROS26. *J. Biol. Chem.* **272**: 10080-86
- Gerards, W.L.H., deJong, W.W., Bloemendal, H., Boelens, W.** (1998) The Human Proteasomal Subunit HsC8 Induces Ring Formation of Other α -Type Subunits. *J. Mol. Biol.* **275**: 113-121
- Gerlinger, U.M., Güümlichel, R., Hoffmann, M., Wolf, D.H., Hilt, W.** (1997) Yeast cycloheximide-resistant crl mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol. Biol. Cell* **8** (12): 2487-2499
- Ghislain, M., Udvardy, A., Mann, C.** (1993) *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature* **366** (6453): 358-362
- Gille, C., Goede, A., Schlöetelburg, C., Preißner, R., Kloetzel, P.-M., Göbel, U. B., Frömmel, C.** (2003) A Comprehensive View on Proteasomal Sequences: Implications for the Evolution of the Proteasome. *J. Mol. Biol.* **326**: 1437-1448
- Gillette, T.G., Huang, W., Russell, S.J., Reed, S.H., Johnston, S.A., Friedberg, E.C.** (2001) The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast. *Genes Dev.* **15**: 1528-1539
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., Finley, D.** (1998a) The regulatory particle of the *S. cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* **18** (6): 3149-3162
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D.** (1998b) A Subcomplex of the Proteasome Regulatory Particle Required for Ubiquitin-Conjugate Degradation and Related to the COP9-Signalsome and eIF3. *Cell* **94**: 615-23
- Glickman, M.H.** (2000) Getting in and out of the proteasome. *semin. Cell Dev. Biol.* **11**: 149-158

- Glickman, M.H., Maytal, V.** (2002) Regulating the 26S Proteasome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **268**: 43-72
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H. et al.** (1996), Life with 6000 genes. *Science* **274** (5287): 546, 563-567
- Gorbea, C., Taillandier, D., Rechsteiner, M.** (2000) Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26S proteasome : S2 and S5b form a tetramer with ATPase subunits S4 and S7. *J. Biol. Chem.* **275** (2): 875-882
- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A.D., Hartmann, E., Laskey, R.A.** (1995) Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377** (6546): 246-48
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A., Hartmann, E.** (1996a) A 41 amino acid motif in importin alpha confers binding to importin beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* **15** (8): 1810-17
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., Bischoff, F.R.** (1996b) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* **15** (20): 5584-5594
- Görlich, D., Kutay, U.** (1999) Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 607-60
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R.** (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å. *Nature* **386** (6624): 463-471
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jäger, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H., Huber, R.** (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: A mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10976-10983
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M., Finley, D.** (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* **7** (11): 1062-1067
- Groll, M., Branddstetter, H., Bartunik, H., Bourenkow, G., Huber, R.** (2003) Investigations on the Maturation and Regulation of Archaeobacterial Proteasomes. *J. Mol. Biol.* **327**: 75-83
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., Hegemann, J.H.** (1996), A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acid Res.* **24** (13): 2519-2524
- Guthrie, C. und Fink, G.R.** (1991), Guide to yeast Genetics and Molecular Biology. *Methods in Enzymology* **194**
- Guzder, S.N., Bailly, V., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S.** (1995) Yeast DNA repair protein RAD23 promotes complex formation between transcription factor TFIIH and DNA damage recognition factor RAD14. *J. Biol. Chem.* **270** (15): 8385-8388

- Haber, J.E.** (1999) Sir-Ku-itous Routes to Make Ends Meet. *Cell* **97**: 829-832
- Haigh, N.G. und Johnson, A.E.** (2002) Protein sorting at the membrane of the endoplasmic reticulum. In Dalbey, R. E. und von Heijne, G. (eds), *Protein Targeting, Transport and Translocation*. Academic Press, London, UK, pp. 74-106
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., Gordon, C.** (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Bioch. Sci.* **28** (1): 26-31
- Haracska, L., Udvardy, A.** (1996) Dissection of the regulator complex of the Drosophila 26S protease by limited proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220** (1): 166-170
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C., Wolf, D.H.** (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* **10**: 555-562
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Möhrle, V., Mahé, Y. und Wolf, D.H.** (1993), *PRE2*, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked *RING10* gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **268** (7): 5115-5120
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D.H.** (1997) The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* **272** (40): 25200-25209
- Heinemeyer, W.** (1999) Mechanismus und Funktion des Proteasoms der Hefe. Habilitationsschrift, Universität Stuttgart
- Heinemeyer, W.** (2000) Active Sites and Assembly of the 20S Proteasome. In *Proteasomes*, eds. Wolf, D. H., Hilt, W.; Eurekah.com, Landes Bioscience Publishing Company, Georgetown, Texas, USA 2000
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1992), The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 761-807
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1998), The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-479
- Hieda, M., Tachibana, T., Yokoya, F., Kose, S., Imamoto, N., Yoneda, Y.** (1999) A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J. Cell Biol.* **144** (4): 645-55
- Hieter, P., Bassett, D.E. und Valle, D.** (1996), The yeast genome--a common currency. *Nat. Genet.* **13** (3): 253-255
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M., Wolf, D.H.** (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **273**: 1725-1728

- Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T., Wolf, D.H.** (1993) The *PRE4* Gene Codes for a Subunit of the Yeast Proteasome Necessary for Peptidylglutamyl-Peptide-hydrolyzing Activity. *J. Biol. Chem.* **268** (5): 3470-3486
- Hilt, W. und Wolf, D.H.** (1995), Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: Genes, structure and functions. *Mol. Biol. Rep.* **21** (1): 3-10
- Hilt, W. und Wolf, D.H.** (1996), Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21** (3): 96-102
- Hirsch, C., Ploegh, H.L.** (2001) Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol.* **10**: 268-272
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A. et al.** (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S.** (2002) *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135-141
- Hoeijmakers, J.H.** (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374
- Holzhütter, H.G., Frömmel, C., Kloetzel, P.-M.** (1999) A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20S proteasome. *J. Mol. Biol.* **286** (4): 1251-1265
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K.** (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., Tanaka, K.** (2003) The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J.* **22**(14): 3557-3567
- Inai, Y., Nishikimi, M** (2002) Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26S proteasome assembly. *Arch. Biochem. Biophys.* **404**: 279-284
- Innis, M.A. et al.** (1990), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, N. Y.
- Ishizuka, M., Takayama, H., Takeuchi, T., Umezawa, H.** (1967), Activity and toxicity of bleomycin. *J. Antibiot.* **20** (1): 15-24
- Jakob, C. A., Burda, P., Roth, J., Aebi, M.** (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J. Cell Biol.* **142** (5): 1223-1233
- Jakob, C A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y., Aebi, M.** (2001) Hrm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep.* **2** (5): 423-430

- Jansen, L.E., Verhage, R.A., Brouwer, J.** (1998) Preferential binding of yeast Rad4.Rad23 complex to damaged DNA. *J. Biol. Chem.* **273** (50): 33111-33114
- Jäger, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D.H., Heinemeyer, W.** (1999) Proteasome β -type Subunits: Unequal Roles of Propeptides in Core Particle Maturation and a Hierarchy of Active Site Function. *J. Mol. Biol.* **291**: 997-1013
- Jäger, S., Strayle, J., Heinemeyer, W., Wolf, D.H.** (2001) Cic1, an adaptor protein specifically linking the 26S proteasome to its substrate, the SCF component Cdc4. *EMBO J.* **20** (10): 4423-4431
- Jarosch, E., Lenk, U., Sommer, T.** (2003) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int. Rev. Cytol.* **223**: 39-81
- Jelinsky, S.A., Estep, P., Church, G.M., Samson, L.D.** (2000) Regulatory Networks Revealed by Transcriptional Profiling of Damaged *Saccharomyces cerevisiae* Cells: Rpn4 Links Base Excision Repair with Proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* **20** (21): 8157-8167
- Jentsch, S.** (1992), The ubiquitin conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 179-207
- Jentsch, S. und Ulrich, H.D.** (1998), Protein breakdown. Ubiquitous deja vu. *Nature* **395** (6700): 321-323
- Jin, C., Reed, J.C.** (2002) Yeast and apoptosis. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **3**: 453-459
- Kahana, A., Gottschling, D.E.** (1999) *DOT4* Links Silencing and Cell Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19** (10): 6608-6620
- Kaiser, P., Moncollin, V., Clarke, D.J., Watson, M.H., Bertolaet, B.L., Reed, S.I., Bailly, E.** (1999) Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. *Genes Dev.* **13** (9): 1190-1202
- Kaplun, L., Ivantsiv, Y., Kornitzer, D., Raveh, D.** (2000) Functions of the DNA damage response pathway target Ho endonuclease of yeast for degradation via the ubiquitin-26S proteasome system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (18): 10077-10082
- Keszenman, D.J., Salvo, V.A., Nunes, E.** (1992) Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways. *J. Bacteriol.* **174** (10): 3125-3132
- Khanna, K.K., Jackson, S.P.** (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet.* **27** (3): 247-254
- Kim J.H., Park, K.C., Chun, S.S., Bang, O., Chung, C.H.** (2003) Deubiquitinating Enzymes as Cellular Regulators. *J. Biochem.* **134**: 9-18

- Kiser, G.L., Gentzsch, M., Kloser, A.K., Balzi, E., Wolf, D.H., Goffeau, A., Riordan, J.R.** (2001) Expression and Degradation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **390** (2): 195-205
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo K.M., Goldberg, A.L.** (1999) The size of peptides generated from protein by mammalian 26S and 20S proteasomes. Implications for understanding the degradation mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274** (6): 3363-3371
- Kloetzel, P.-M.** (2001) Antigen Processing by the Proteasome. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **2**: 179-187
- Köhler, A., Cascio, P., Legget, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L., Finley, D.** (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell* **7**: 1143-1152
- Kopp, F., Kuehn, L.** (2003) Orientation of the 19S Regulator Relative to the 20S Core Proteasome: An Immunoelectron Microscopic Study. *J. Mol. Biol.* **329**: 9-14
- Kornitzer, D., Ciechanover, A.** (2000) Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell. Physiol.* **182** (1): 1-11
- Kostova, Z., Wolf, D.-H.** (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* **22** (10): 2309-2317
- Krüger, E., Kloetzel, P.-M., Enenkel, C.** (2001) 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* **83**: 289-293
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., Görlich, D.** (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90** (6): 1061-71
- Laemmli, U.K.** (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259): 680-685
- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., Pickart, C.M.** (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* **416**: 763-767
- Lambertson, D., Chen, L., Madura, K.** (2003) Investigating the importance of proteasome-interaction for Rad23 function. *Curr. Genet.* **42**: 199-208
- Legget, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H., Finley, D.** (2002) Multiple Associated Proteins Regulate Proteasome Structure and Function. *Mol. Cell* **10**: 495-507

- Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P.-M., Enenkel, C.** (2002) 20S Proteasomes are Imported as Precursor Complexes into the Nucleus of Yeast. *J. Mol. Biol.* **317**: 401-413
- Leitzgen, K., Haas, I.G.,** (1998) Protein maturation in the endoplasmic reticulum. *CHEMTRACTS-Biochem. Mol. Biol.* **11**: 423-445
- Lewis, L.K., Resnick, M.A.** (2000) Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* **451**: 71-89
- Lisby, M., Rothstein, R., Mortensen, U.H.** (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98** (15): 8276-8282
- Ligr, M., Madeo, F., Fröhlich, E., Hilt, W., Fröhlich, K.-U., Wolf, D.H.** (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.* **438** (1-2): 61-65
- Ligr, M., Velten, I., Fröhlich, E., Madeo, F., Ledig, M., Fröhlich, K.-U., Wolf, D.H., Hilt, W.** (2001) The Proteasomal Substrate Stm1 Participates in Apoptosis-like Cell Death in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2422-2432
- Lommel, L., Chen, L., Madura, K., Sweder, K.** (2000) The 26S proteasome negatively regulates the level of overall genomic nucleotide excision repair. *Nucl. Ac. Res.* **28** (24): 4839-4845
- Lommel, L., Ortolan, T., Chen, L., Madura, K., Sweder, K. S.** (2002) Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26S proteasome. *Curr. Genet.* **42**: 9-20
- Longtine, M., McKenzie III, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., Pringle, J.R.** (1998) Additional Modules for Versatile and Economical PCR-based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R.** (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4Å resolution. *Science* **268** (5210): 533-539
- Lowndes, N.F., Murguia, J.R.** (2000) Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **10**: 17-25
- Lupas, A., Koster, A.J., Baumeister, W.** (1993) Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enz. Prot.* **47** (4-6): 252-273
- Lupas, A., Flanagan, J. M., Tamura, T., Baumeister, W.** (1997) Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci.* **22** (10): 399-404
- Ma, C.P., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N.** (1992) Identification, purification and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain). *J. Biol. Chem.*, **267** (15): 10515-10523

- Madeo, F., Fröhlich, E., Fröhlich, K.-U.** (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.* **139** (3): 729-734
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Sigrist, S., Gray, M., Wolf, D.H., Fröhlich, K.-U.** (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **145** (4): 757-767
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., Fröhlich, K.-U.** (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell.* **9** (4): 911-917
- Mancini, R., Aebi, M., Helenius, A.** (2003) Multiple ER-associated pathways degrade mutant yeast carbocypeptidase Y (CPY*) in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **278** (47): 46895-46905
- Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., Feldmann, H.** (1999) Rpn4 acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Letters* **450**: 27-34
- Maupin-Furlow, J.A., Wilson, H.L., Kaczowka, S.J., Ou, M.S.** (2000) Proteasomes in the archaea: from structure to function. *Front. Biosci.* **5**: D837-D865
- Mc Donald, H.B. und Byers, B.** (1997) A proteasome cap subunit required for spindle pole body duplication in yeast. *J. Cell Biol.* **137** (3): 539-553
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., Krüger, E.** (2003) Inhibition of Proteasome Activity Induces Concerted Expression of Proteasome Genes and *de novo* Formation of Mammalian Proteasomes. *J. Biol. Chem.* **278** (24): 21517-25
- Mhammedi-Alaoui, A., Pato, M., Gama, M.J., Toussaint, A.** (1994) A new component of bacteriophage Mu replicative transposition machinery: The *Escherichia coli* ClpX protein. *Mol. Microbiol.* **11** (6): 1109-1116
- Moore, C.W.** (1991), Further Characterizations of Bleomycin-Sensitive (*blm*) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with Implications for a Radiomimetic Model. *J. Bacteriol.* **173** (11): 3605-3608
- Moore, C.W.**, Bleomycin. In: *Encyclopedia of Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 1999, pp. 292-297
- Moore, M.S.** (1998) Ran and nuclear transport. *J. Biol. Chem.* **273** (36): 22857-22860
- Murakami, Y., Natsufuji, S., Hayashi, S.I., Tanahashi, N., Tanaka, K.** (2000) Degradation of ornithin decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267** (1): 1-6
- Muratani, M., Tansey, W.P.** (2003) How the Ubiquitin-Proteasome System controls Transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 1

- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B., Monaco, J.J.** (1997) Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor β subunits. *EMBO J.* **16** (17): 5363-5375
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V.** (1999) AAA⁺: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**: 27-43
- Nguyen, M.M., Livingston, D.M.** (1997) The Effect of a Suppressed *rad52* Mutation on the Suppression of *rad6* by *srs2*. *Yeast*, **13** (11): 1059-1064
- Nussbaum, A., Dick, T.P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanovic, S. et al.** (1998) Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome β subunits deduced from digests of enolase1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (21): 12504-12509
- Orian, A., Schwartz, A.L., Israël, A., Whiteside, S., Kahana, C., Ciechanover, A.** (1999) Structural Motifs Involved in Ubiquitin-Mediated Processing of the NF- κ B Precursor p105: Roles of the Glycine-Rich Region and a Downstream Ubiquitination Ddomain. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3664-3673
- Orr-Weaver, T., Szostak, J. und Rothstein, R.J.** (1981), Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (10): 6354-6358
- Pastink, A., Eeken, J.C.J., Lohman, P.H.M.** (2001) Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mut. Res.* **480-481**: 37-50
- Papa, R., Amerik, A.Y., Hochstrasser, M.** (1999) Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* **10** (3): 741-756
- Petering, D.H., Byrnes, R.W., Antholine, W.E.** (1990), The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chem. Biol. Interact.* **73** (2-3): 133-182
- Peters, L.M., Franke, W.W., Kleinschmidt, J.A.** (1994) Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **269** (10): 7709-7718
- Plempner, R.K., Böhmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., Wolf, D.H.** (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388** (6645): 891-895
- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K., Wolf, D.H.** (1998) Endoplasmic Reticulum Degradation of a Mutated ATP-binding Cassette Transporter Pdr5 Proceeds in a Concerted Action of Sec61 and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* **273** (49): 32848-32856
- Plempner, R.K., Bordallo, J., Deak, P.M., Taxis, C., Hitt, R., Wolf, D.H.** (1999a) Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J. Cell Sci.* **112**: 4123-4134

- Plempner, R.K., Deak, P.M., Otto, R.T., Wolf, D.H.** (1999b) Re-entering the translocon from the luminal side of the endoplasmic reticulum. Studies on mutated carboxypeptidase yscY species. *FEBS Letters* **443**: 241-245
- Plempner, R.K., Wolf, D.H.** (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.*, **24**: 266-270
- Podlaska, A., McIntyre, J., Skoneczna, A., Sledziwska-Gojska, E.** (2003) The link between 20S proteasome activity and post-replication DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **49** (5): 1321-1332
- Ramos, P.C., Höckendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., Dohmen, R.J.** (1998) Ump1p is Required for Proper Maturation of the 20S Proteasome and Becomes Its Substrate upon Completion of the Assembly. *Cell* **92**: 489-499
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B., Kutay, U.** (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 271-303
- Rexach, M., Blobel, G.** (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83** (5): 683-92
- Ribbeck, K., Görlich, D.** (2002) The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* **21**(11): 2664-2671
- Richter-Ruoff, B., Heinemeyer, W. und Wolf, D.H.** (1992), The proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase. *In vivo* function in the ubiquitin-dependent N-end rule pathway of protein degradation in eukaryotes. *FEBS Lett.* **302** (2): 192-196
- Richter-Ruoff, B. und Wolf, D.H.** (1993), Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the proteasome on mitotic cyclins in yeast. *FEBS Lett.* **336** (1): 34-36
- Rockel, T.D., von Mikecz, A.** (2002) Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J. Struct. Biol.* **140**: 189-199
- Rose, A.H. und Harrison, R.S.** (Hsg.), The Yeasts. Academic Press, London. Vol. 1 (1987), Vol. 2 (1987), Vol. 3 (1989), Vol. 4 (1991)
- Russell, S.J., Steger, K.A., Johnston, S.A.** (1999a) Subcellular Localization, Stoichiometry and protein levels in 26S Proteasome Subunits in Yeast. *J. Biol. Chem.* **274** (31): 21943-21952
- Russell, S.J., Reed, S.H., Huang, W., Friedberg, E.C., Johnston, S.A.** (1999b) The 19S Regulatory Complex of the Proteasome Functions Independently of Proteolysis in Nucleotide Excision Repair. *Mol. Cell* **3**: 687-695
- Sambrook J., Fritsch, E. und Maniatis, T.** (1989), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, Plainville, N. Y.

- Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W., Madura, K.** (1998) Rad 23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* **391**: 715-718
- Schekman, R., Esmon, B., Ferro-Novick, S., Tield, C. und Novick, P.** (1983), Yeast secretory mutants: Isolation and Characterization. *Methods Enzymol.* **96**: 802-815
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frömmel, C., Löwe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M., Schmidt, M.** (1996) Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: The maturation of β -subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.* **15(24)**: 6887-6898
- Schmidtke, G., Schmidt, M., Kloetzel, P.-M.** (1997) Maturation of Mammalian 20S Proteasome: Purification and Characterization of 13S and 16S Proteasome Precursor Complexes. *J. Mol. Biol.* **268**: 95-106
- Seufert, W., Futcher, B. und Jentsch, S.** (1995), Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M- Phase cyclins. *Nature* **373 (6509)**: 78-81
- Severin, F.F., Hyman, A.A.** (2002) Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* **12**: R233-R235
- Shamu, C.E., Walter, P.** (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* **15 (12)**: 3028-3039
- Sheaff, R., Singer, J.D., Swanger, J., Sunitherman, M., Roberts, J.M., Clurman, B.E.** (2000) Proteasomal turnover of p21^{Cip1} does not require p21^{Cip1} ubiquitination. *Mol. Cell* **5**: 403-410
- Sidrauski, C., Walter, P.** (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90 (6)**: 1031-1039
- Sidrauski, C., Brickner, J.H., Walter, P.** (2002) The unfolded protein response. In Dalbey, R. E. und von Heijne, G. (eds), *Protein Targeting, Transport and Translocation*. Academic Press, London, UK, pp. 151-179
- Steighner, R.J., Povirk, L.F.** (1990), Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: implications for the mechanism of double-strand cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87 (21)**: 8350-8354
- Struhl, K., Smith, J.A., Seidmann, J.G., Moore, D.D., Kingston, R.E., Brent, R. und Ausubel, F.** (1987-1995), Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School
- Swanson, R., Locher, M., Hochstrasser, M.** (2001) A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev.* **15 (20)**: 2660-2674

- Sweder, K., Madura, K.** (2002) Regulation of Repair by the 26S Proteasome. *J. Biomed. Biotech.* **2** (2): 94-105
- Takeuchi, J., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Tanaka, K., Toh-e, A.** (1999) Rpn9 Is Required for Efficient Assembly of the Yeast 26S Proteasome. *Mol. Cell. Biol.* **19** (10): 6575-6584
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich F., Cejka, Z., et al.** (1995), The first characterization of an eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr. Biol.* **5** (7): 766-74
- Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W., Tamura, T.** (1998) The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* **95** (5): 637-648
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A., Ichihara, A.** (1990) Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Letters* **271** (1-2): 41-46
- Taxis, C., Hitt, R., Park, S.-H., Deak, P.M., Kostova, Z., Wolf, D.H.** (2003) Use of Modular Substrates Demonstrates Mechanistic Diversity and Reveals Differences in Chaperone Requirement of ERAD. *J. Biol. Chem.* **278** (38): 35903-35913
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.** (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19** (1): 94-102
- Thumm, M.** (2000) Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microscop. Res. Tech.* **51** (6): 563-72
- Thumm, M. und Wolf, D.H.** (1998) From proteasome to lysosome: Studies on yeast demonstrate the principles of protein degradation in the eukaryote cell. *Adv. Mol. Cell Biol.*, A. J. Bivett (Hsg.), Greenwich: JAI Press, 41-67
- Tone, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Toh-e, A.** (2000) Nob1p, a new essential protein, associates with the 26S proteasome of growing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Gene* **243**: 37-45
- Tone, Y., Toh-e, A.** (2002) Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **16**: 3142-3157
- Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J.** (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (9): 4350-4354
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P.** (2000) Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation. *Cell* **101**: 249-258

- Umezawa, H.** (1979) Advances in bleomycin studies. In: Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects, Hecht, S. M. and Springer-Verlag (eds.), New York, pp. 24-36
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G., Rechsteiner, M.** (2002) PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.* **21** (13): 3516-3525
- Varshavsky, A.** (1992) The N-end rule: *Cell* **69** (5): 725-735
- Varshavsky, A.** (1997) The N-end rule pathway for protein degradation. *Genes Cells* **2** (1): 13-28
- Varshavsky, A.** (2003) The N-end rule and regulation of apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **5** (5): 373-376
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., Deshaies, R.J.** (2000) Proteasomal Proteomics: Identification of Nucleotide-sensitive Proteasome-interacting Proteins by Mass Spectrometric Analysis of Affinity-purified Proteasomes. *Mol. Biol. Cell* **11**: 3425-3439
- Verma, R., Deshaies, R.J.** (2000) A Proteasome Howdunit: The Case of the Missing Signal. *Cell* **101**: 341-344
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W.** (1999) The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 1015-1068
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. und Philippsen, P.** (1994), New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10** (13): 1793-1808
- Walter, J., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T.** (2001) Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J.* **20** (12): 3124-3131
- Watkins, J.F., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S.** (1993) The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene *RAD23* encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol. Cell. Biol.* **13** (12): 7757-7765
- Warbrick, E.** (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *BioEssays* **22** (11): 997-1006
- Weis, K., Ryder, U., Lamond, A.I.** (1996) The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J.* **15** (8): 1818-25
- Weis, K.** (1998) Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* **23** (5): 185-9
- Weis, K.** (2003) Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle. *Cell* **112**: 441-451

- Wilkinson, C.R.M., Wallace M., Morpew, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J.P., McIntosh, J.R., Gordon, C.** (1998) Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *EMBO J.* **17** (22):6465-6476
- Wilkinson, C.R.M., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., Gordon, C.** (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat. Cell Biol.* **3** (10): 939-943
- Wójcik, C.** (1999) Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 908-917
- Wójcik, C., DeMartino, G.N.** (2003) Intracellular localization of proteasomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**: 579-589
- Wolf, D.H. und Fink, G.R.** (1975) Proteinase C (carboxypeptidase Y) mutant of yeast. *J. Bacteriol.* **123** (3): 1150-1156
- Wolf, S., Nagy, I., Lupas, A., Pfeifer, G., Cejka Z., Muller, S.A., Engel, A., De Mot, R., Baumeister, W.** (1998) Characterization of ARC, a divergent member of the AAA ATPase family from *Rhodococcus erythropolis*. *J. Mol. Biol.* **277** (1): 13-25
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17** (9): 3469-3478
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R.** (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306
- Xie, Y., Varshavsky, A.** (2000) Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (6): 2497-2502
- Xie, Y., Varshavsky, A.** (2001) RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: A negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (6): 3056-3061
- Yang, Y., Früh, K., Ahn, K., Peterson, P.A.** (1995) *In vivo* assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J. Biol. Chem.* **270**: 27687-27694
- Yang, Y., Yu, X.** (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.* **17**: 790-799
- Yao, T., Cohen, R.E.** (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419** (6905): 403-7
- Ye, Y., Meyer, H.H., Rapoport, T.A.** (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**: 652-656

Zühl, F., Tamura, T., Dolenc, I., Cejka, Z., Nagy, I., De Mot, R., Baumeister, W. (1997a) Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome. *FEBS Lett.* **400** (1): 83-90

Zühl, F., Seemüller, E., Golbik, R., Baumeister, W. (1997b) Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome. *FEBS Lett.* **418** (1-2): 189-194

Zwickl, P., Lottspeich, F., Baumeister, W. (1992) Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **312** (2-3): 157-60

Zwickl, P., Kleinz, J., Baumeister, W. (1994) Critical elements in proteasome assembly. *Nat. Struct. Biol.* **1** (11): 765-70

Zwickl, P., Goldberg A. L., Baumeister, W. (1999) In *Proteasomes*, ed. Wolf, D. H., Hilt, W.; Eureka.com, Landes Bioscience Publishing Company, Georgetown, Texas, USA 2000

Danksagung

- Ich danke Herrn Prof. Dr. P.-M. Kloetzel für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und die Gelegenheit zur Anfertigung dieser Arbeit.
- Dr. Cordula Enenkel danke ich für die engagierte Betreuung.
- Allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Dr. Ulrike Kuckelkorn, Ilse Drung, Renate Standera, Annett Helfrich, Dr. Beate Braun, Hugo Molina-Leddy, Dr. Peter Henklein und Frau Hoffmann möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft danken. Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Andrea Lehmann für die hervorragende technische Assistenz, für die Klonierung von Blm3-GFP und für die Nativgele sowie Petra Wendler, die Blm3 in Präparationen von Vorläuferkomplexen entdeckte (Abb. 39). Weiterhin danke ich Dr. Regine Kraft, Dr. Katharina Janek und Dr. Sabine Baumgärtner für die massenspektrometrische Analyse zahlreicher Proteine.
- Ich danke Herrn Prof. Dr. D.-H. Wolf, der mir die Möglichkeit gab, einige Experimente am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart durchzuführen, sowie seinen ehemaligen Mitarbeitern Dr. Christof Taxis und Dr. Rainer Hitt für ihre Hilfsbereitschaft.
- Für Plasmide und Stämme danke ich Dr. C. Enenkel, Dr. Beate Braun, Petra Wendler, Dr. Christof Taxis, Dr. Rainer Hitt und Dr. Jürgen Dohmen.
- Mein weiterer Dank gilt meinen Geschwistern Michaela und Dominik für Rat und Tat und meinem Freund Stefano Consiglio für das Korrekturlesen.
- Meiner Freundin Susanne Müller danke ich für Motivation und ihre wertvollen Ratschläge.
- Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets ermutigt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit auf der Grundlage der angegebenen Hilfsmittel selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet und verfasst zu haben.

Berlin, den 8. März 2004

Lebenslauf

02.12.1970	geboren in Lüdinghausen, Kreis Coesfeld
1977-1980	Besuch der Grundschule in Lüdinghausen
1980-1981	Besuch der Grundschule in Alsbach-Hähnlein, Kreis Darmstadt-Dieburg
1981-1984	Besuch des Gymnasiums in Bensheim, Kreis Heppenheim
1984-1990	Besuch des Gymnasiums in Müllheim, Kreis Breisgau-Hochschwarzwald
1990	Abitur am Markgräfler Gymnasium Müllheim
ab 10/90	Studium der Chemie an der Universität Stuttgart mit Vertiefungsfach „Biochemie“
01/99- 07/99	Diplomarbeit „Die Lyse autophagischer Vesikel in <i>S. cerevisiae</i> – Isolation neuer essentieller Komponenten“ am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart bei Prof. Dr. D.-H. Wolf, AG Dr. M. Thumm
09/99 – 12/99	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart
01/00 – 06/03	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der Charité, Berlin bei Prof. P.-M. Klotzel, AG Dr. C. Enenkel; Anfertigung der Dissertation

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Fehlker, M. (1999) „Die Lyse autophagischer Vesikel in *S. cerevisiae* – Isolation neuer essentieller Komponenten“, Diplomarbeit, Universität Stuttgart

Fehlker, M., Wendler, P., Lehmann, A., Enenkel, C. (2003) Blm3 is part of nascent proteasomes and involved in a late step of nuclear proteasome maturation. *EMBO Rep.* **4 (10)**: 959-963